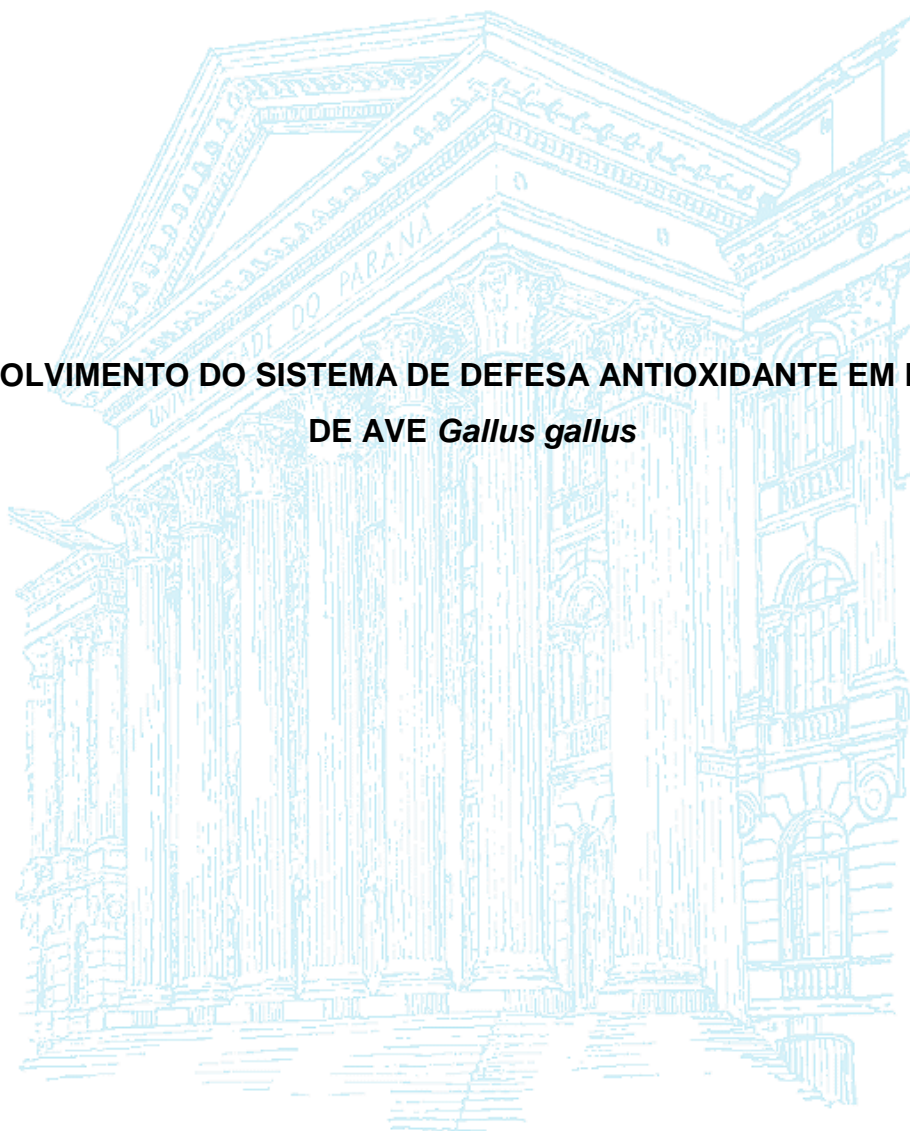


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MELYSSA KMECICK

**DESENVOLVIMENTO DO SISTEMA DE DEFESA ANTIOXIDANTE EM EMBRIÕES
DE AVE *Gallus gallus***



CURITIBA

2014

MELYSSA KMECICK

Desenvolvimento do sistema de defesa antioxidante em embriões de ave
Gallus gallus

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Coordenação do Curso de Biomedicina da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para obtenção do grau de bacharel em Biomedicina.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Claudia Feijó Ortolani-Machado.

Coorientador: Prof. Dr. Francisco Filipak Neto

CURITIBA

2014

Agradecimentos

À Deus por me dar forças e me mostrar que os planos quem faz é Ele.

Aos meus pais por todo amor, incentivo e apoio. Por desde sempre, fazerem da minha educação uma prioridade e por me ensinarem a importância dos estudos.

Aos familiares por compreenderem a ausência e sempre confiarem em mim.

Ao André, melhor amigo e namorado, pela confiança, apoio, amor, paciência e palavras de carinho.

Às amigas, Bruna, Letícia, Ludiana e Valéria, por serem minhas companheiras desde o início do curso, pela amizade, cumplicidade e por todos os momentos que passamos. Sem vocês não existiriam sobreviventes!

À minha orientadora, professora Claudia Feijó Ortolani-Machado, pela paciência, conselhos e por acreditar em mim.

Ao meu coorientador, professor Francisco Filipak Neto, por toda ajuda com os experimentos e análises estatísticas.

Aos colegas do laboratório de Biologia do Desenvolvimento/Embriotoxicologia, e Toxicologia Celular, pelo convívio, apoio e auxílio, principalmente ao Samuel, por toda a paciência e ajuda com as análises.

Enfim, a todos que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho.

RESUMO

O embrião de ave *Gallus gallus* é um modelo amplamente utilizado em estudos de embriologia comparada e embriotoxicologia, por possuir tempo de desenvolvimento curto e muito semelhante ao dos mamíferos nos primeiros estádios. Os biomarcadores morfológicos são bastante empregados nesse modelo para avaliar os riscos potenciais de xenobióticos sobre o desenvolvimento embrionário, porém os biomarcadores bioquímicos ainda são pouco explorados. O sistema antioxidante é composto por defesas enzimáticas e não enzimáticas, que juntas mantêm o equilíbrio redox afim de preservar as funções do organismo e evitar danos às biomoléculas. O balanço redox é essencial também durante o desenvolvimento embrionário e diferenciação celular, processos em que as espécies reativas funcionam como moléculas sinalizadoras em vias de ativação da expressão gênica. Em aves, o sistema de defesa antioxidante é mais estudado em órgãos específicos, em períodos mais tardios do desenvolvimento. Nesse contexto, o objetivo desse trabalho foi determinar os níveis basais de atividade das enzimas catalase, superóxido dismutase e glutathione S-transferase e da concentração de tióis não proteicos, em embriões de ave do 3º ao 10º dia de incubação, a fim de facilitar o emprego posterior deste modelo em estudos de embriotoxicidade. Não foi possível avaliar as atividades da catalase e superóxido dismutase a partir das metodologias empregadas nesse trabalho. A concentração de tióis não proteicos obtida foi máxima no 5º dia e diminuiu ao longo do período de desenvolvimento estudado, tornando-se mínima no 9º dia. A atividade da GST foi intensificada do 3º ao 9º dia, quando foi duas vezes maior que no 8º. Dessa forma, por um possível mecanismo de compensação, de redução das defesas não enzimáticas e aumento das enzimáticas, o balanço redox é mantido a fim de que os diferentes processos envolvidos no desenvolvimento ocorram normalmente. Pode-se dizer que o sistema antioxidante do embrião de ave *Gallus gallus* se torna mais robusto ao longo do desenvolvimento. Isso deverá ser confirmado, futuramente, com análises de outros sistemas como SOD, CAT e glutathione peroxidase.

Palavras-chave: Embrião de ave. Sistema antioxidante. Desenvolvimento embrionário. Glutathione. Catalase. Superóxido dismutase. Glutathione S-transferase.

ABSTRACT

Chicken embryo *Gallus gallus* is a highly used model in comparative embryology and embryotoxicology, in particular because it has a short developmental period that is very similar to that of mammals for the first stages. Morphologic biomarkers are quite used in this model to assess the potential risks of exposure to xenobiotics in embryo development, however biochemical biomarkers are underexplored. The antioxidant system consists of enzymatic and non-enzymatic defense, which together maintains the redox balance in order to preserve normal functions and prevent damage. The redox balance is also important during embryonic development and cell differentiation, working as signaling molecules in gene expression activation pathways. In birds, the antioxidant defense is more studied in particular organs, in later periods of development. In this context the aim of this study was to determine the baseline activity of catalase, superoxide dismutase, glutathione S-transferase and the content of non-protein thiols in chicken embryos from 3 to 10 days of incubation, in order to facilitate later use of this model in embryotoxicity studies. It was not possible to assess the activities of catalase and superoxide dismutase from the methods used in this work. The concentration of non-protein thiols obtained was maximum on the 5th day and decreased over the period of development used in this study, becoming minimal at the 9th day. The activity of GST was intensified from 3rd to 9th day, when it was twice that on the 8th. Thus, by a possible compensation mechanism, of reducing non-enzymatic defense and increasing enzyme defense, the redox balance is maintained so that the processes involved in development can occur normally. It can be said that the antioxidant system of *Gallus gallus* embryo becomes more robust during development. This should be confirmed with assessment of other systems such as SOD, CAT and glutathione peroxidase.

Keywords: Chicken embryo. Antioxidant defense system. Embryonic development. Glutathione. Catalase. Superoxide dismutase. Glutathione S-transferase.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	6
2 REVISÃO DE LITERATURA	7
2.1 BIOMARCADORES	7
2.2 ESTRESSE OXIDATIVO	7
2.3 DANO OXIDATIVO	9
2.4 DEFESA ANTIOXIDANTE	10
2.5 ESPÉCIES REATIVAS E DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO	12
2.6 EMBRIÃO DE AVE COMO MODELO	14
2.7 DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO DE <i>Gallus gallus</i>	15
2.8 O SISTEMA ANTIOXIDANTE DO EMBRIÃO DE GALINHA.....	18
3. OBJETIVOS.....	20
3.1 OBJETIVO GERAL	20
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
4 MATERIAIS E MÉTODOS	20
4.1 MODELO BIOLÓGICO	20
4.2 CONCENTRAÇÃO PROTEICA	27
4.3 SISTEMA ANTIOXIDANTE	28
4.3.1 Concentração de tióis não protéicos como a GSH	29
4.3.2 Atividade da Glutathione S-transferase	29
4.3.3 Atividade da Superóxido dismutase.....	30
4.3.4 Atividade da Catalase	31
4.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	31
5 RESULTADOS.....	32
5.1 CONCENTRAÇÃO DE TIÓIS NÃO PROTEICOS COMO A GSH	32
5.2 ATIVIDADE DA GLUTATHIONE S-TRANSFERASE	32
5.3 ATIVIDADE DA SUPERÓXIDO DISMUTASE.....	33
5.4 ATIVIDADE DA CATALASE.....	34
6 DISCUSSÃO	34
7 CONCLUSÕES.....	38
8 PERSPECTIVAS FUTURAS.....	38
9 REFERÊNCIAS.....	39

1 INTRODUÇÃO

As atividades antrópicas produzem, em abundância, uma grande variedade de resíduos urbanos, industriais e agrícolas, que são constantemente liberados no ambiente e acabam por contaminar e deteriorar ecossistemas terrestres e aquáticos. A partir do século XX, diferentes tipos de poluentes orgânicos e inorgânicos como os compostos organoclorados (OCs), bifenilas policloradas (PCBs), hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PAHs), policlorodibenzofuranos (PCDF), policlorobenzodioxinas (PCDD) e metais passaram a ser liberados desenfreadamente no meio ambiente (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003). Desde o início dos anos sessenta, os humanos tornaram-se cientes dos efeitos a longo prazo destes contaminantes e seus riscos potenciais para os ecossistemas aquáticos e terrestres (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003). A partir de então muitos estudos vêm sendo realizados a fim de avaliar o risco de exposição a essas substâncias, seus possíveis efeitos tóxicos e mecanismos de ação (SIJM, OPPERHUIZEN, 1988; GARGIONI *et al.*, 2006; MIRANDA *et al.*, 2008; SISMAN, GEYIKOGLU, 2008; WANG, ZHENG, MENG, 2008; RIBEIRO *et al.*, 2014).

Devido a grande liberação de contaminantes no ambiente e ao crescente número de substâncias com potencial tóxico, faz-se necessária a utilização de modelos biológicos e técnicas cada vez mais eficientes que gerem resultados aplicáveis a uma maior variedade de organismos, inclusive à toxicidade humana.

O uso de diferentes modelos biológicos e biomarcadores permite a investigação dos efeitos tóxicos dos contaminantes em diferentes grupos animais e em diferentes níveis de organização biológica. O embrião de ave é um modelo bastante utilizado, pois é de fácil obtenção e manipulação e tem desenvolvimento inicial semelhante ao de répteis e mamíferos. A maioria dos estudos que avaliam os efeitos induzidos por xenobióticos utilizando esse modelo, fazem-no a partir da avaliação de biomarcadores morfológicos (THOMPSON *et al.*, 2005; THOMPSON; BANNIGAN, 2007; CULLINANE; BANNIGAN; THOMPSON, 2009; THOMPSON *et al.*, 2010). Há poucos trabalhos que utilizam biomarcadores bioquímicos, como os de estresse oxidativo (YAMAMOTO *et al.*, 2012). Para que a utilização destes

biomarcadores seja realizada de forma mais eficiente em embriões de ave contaminados, é necessário conhecer o desenvolvimento do sistema de defesa antioxidante, para que a análise seja realizada em períodos do desenvolvimento que gerem melhores resultados.

Nesse contexto, o objetivo desse trabalho foi determinar níveis basais de componentes do sistema antioxidante em embrião de ave a fim de facilitar o emprego posterior deste modelo em estudos de toxicologia e embriotoxicidade.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 BIOMARCADORES

Segundo Peakall (1994), um biomarcador é uma mudança em uma resposta biológica, que pode ser bioquímica, molecular, celular, fisiológica ou comportamental, e estar relacionada aos efeitos tóxicos de substâncias. Os biomarcadores permitem prever um determinado efeito, o aparecimento de um dano ou doença, causado por contaminantes (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 1987 *apud* VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003). Esse diagnóstico preditivo é possível pois alterações em níveis inferiores de organização biológica funcionam como alertas precoces do aparecimento do efeito de respostas mais tardias (BAYNE *et al.*, 1985 *apud* VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003).

2.2 ESTRESSE OXIDATIVO

O termo estresse oxidativo refere-se a uma condição em que há um desequilíbrio entre a formação de radicais livres e de defesas antioxidantes, com maior produção de moléculas pró-oxidantes (SIES, 1997). Esse desequilíbrio pode levar a um dano oxidativo, causado pelo ataque das espécies reativas, como radicais, a biomoléculas (HALLIWELL; WHITEMAN, 2004).

Radicais são átomos ou moléculas que contém elétrons desemparelhados (LIMA, 2004), que podem ser altamente reativos e gerar reações em cadeia (SEN; CHAKRABORTY, 2010).

As fontes de radicais livres podem ser endógenas ou exógenas (SAILAJA *et al.*, 2011). O metabolismo celular aeróbico normal produz radicais, que possuem várias funções, como sinalização celular, defesa contra organismos invasores, regulação da proliferação e diferenciação celulares, etc (BARREIROS; DAVID, J.M.; DAVID, J.P, 2006). Em situações patofisiológicas geradas por disfunções biológicas ou por patógenos ou agentes tóxicos, a produção excessiva de espécies radiculares pode se tornar prejudicial e causar danos a lipídios de membrana, proteínas, carboidratos e ao DNA (HUSAIN; CILLIARD, J.; CILLIARD, P.; 1987).

Os radicais derivados do oxigênio constituem a principal classe de espécies radiculares produzidas pelos organismos (MILLER; BUETTNER; AUST, 1990). As espécies reativas de oxigênio (EROs) são divididas em dois grupos, as radiculares - oxigênio ($O_2^{\bullet\bullet}$), hidroxila (HO^{\bullet}), superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peroxila (ROO^{\bullet}) e alcóxila (RO^{\bullet}) - e as não radiculares - peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e ácido hipocloroso ($HClO$).

O radical hidroxila pode ser gerado por reação do peróxido de hidrogênio com metais de transição como Fe^{2+} e Cu^+ e por cisão homolítica da água em exposição à radiação ionizante (HALLIWELL; GUTTERIDGE; CROSS, 1992). Possui alta reatividade e está envolvido na peroxidação de lipídios de membrana, oxidação de proteínas, DNA nuclear e mitocondrial, RNA e carboidratos (LIMA, 2004).

O radical superóxido é formado pela auto-oxidação do oxigênio durante a cadeia de transporte de elétrons mitocondrial (SAILAJA *et al.*, 2011). Tem função na resposta inflamatória, na geração de moléculas bactericidas ($HClO$, H_2O_2 e $ONOO^-$). Este radical possui baixa reatividade com biomoléculas, porém pode participar da formação de outras espécies radiculares, como o radical hidroxila e o oxigênio singlete (1O_2), uma forma mais reativa do oxigênio (RONSEIN *et al.*, 2006). O $O_2^{\bullet-}$ é metabolizado pela enzima superóxido dismutase a peróxido de hidrogênio, que é estável (LIMA, 2004), porém é capaz de atravessar membranas celulares com facilidade e gerar o radical hidroxila quando na presença de metais de transição (BARREIROS; DAVID, J.M.; DAVID, J.P, 2006). Na célula o H_2O_2 é reduzido à água pela catalase nos peroxissomos e pela glutathione peroxidase no citosol e mitocôndrias (SAILAJA *et al.*, 2011).

Além das espécies reativas de oxigênio (EROs), existem as de nitrogênio (ERNs), em que o elétron desemparelhado está centrado no átomo de nitrogênio. Entre as ERNs estão o óxido nítrico (NO^{\bullet}), óxido nitroso (N_2O_3), ácido nitroso (HNO_2), nitritos (NO_2^-), nitratos (NO_3^-) e peroxinitritos ($ONOO^-$) (BARREIROS;

DAVID, J.M.; DAVID, J.P, 2006). O óxido nítrico é um gás, produzido no organismo pela enzima óxido nítrico sintase. Não possui carga e atravessa facilmente as membranas biológicas, funcionando como uma molécula transdutora de sinal, cuja principal função é o relaxamento da musculatura lisa vascular. O NO• é pouco reativo, porém pode reagir com o ânion superóxido e formar peroxinitrito, que ataca biomoléculas como o DNA, proteínas e lipídios (LIMA, 2004).

2.3 DANO OXIDATIVO

As espécies reativas atacam diversas classes de biomoléculas, gerando dano oxidativo. Esses danos podem ser avaliados e utilizados como biomarcadores de estresse oxidativo.

A peroxidação lipídica é uma reação em cadeia em que espécies oxidantes degradam fosfolipídios de membrana, diminuindo a fluidez e alterando a permeabilidade. Como consequência dessa reação, há a formação de aldeídos e hidroperóxidos, também reativos com moléculas biológicas. A alteração da permeabilidade de membrana pode modificar o fluxo de íons, a atividade de receptores, proteínas sinalizadoras e enzimas, causar o intumescimento e o rompimento da célula (LIMA, 2004).

Os danos oxidativos a proteínas envolvem diversos mecanismos, como oxidação de resíduos de aminoácidos e grupos tiol (-SH), carbonilação e alterações na estrutura tridimensional das proteínas, fragmentação, agregação e formação de ligações cruzadas. Esses mecanismos podem alterar sítios ativos de enzimas e resíduos essenciais à atividade da proteína, alterando a função ou tornando-as inativas (LIMA, 2004; SAILAJA *et al.*, 2011).

O material genético das células também é alvo de danos por ação dos radicais. Tais danos incluem modificações de bases como hidroxilação, desaminação, abertura do anel das bases nitrogenadas e formação de dímeros de pirimidinas, mediada por radicais hidroxila. Além disso, as espécies reativas podem gerar ligações cruzadas, perda de bases púricas, mutações (citosina quando desaminada produz uracila) e quebras na cadeia de DNA devido a danos ao açúcar desoxirribose (LIMA, 2004).

O estresse oxidativo está envolvido em diversas condições patofisiológicas, como doenças cardiovasculares (aterosclerose) e neurológicas (Alzheimer), câncer, diabetes, isquemia, envelhecimento, entre outras doenças (DALLE-DONNE *et al.*, 2006; DHALLA, TEMSAH, NETTICADAN, 2000; JENNER, 2003; SAYRE, SMITH, PERRY, 2001; VALKO *et al.*, 2007).

2.4 DEFESA ANTIOXIDANTE

A fim de proteger o organismo contra os danos oxidativos causados pelos radicais, existem sistemas de defesa antioxidantes. Segundo Halliwell e Gutteridge (2007) "um antioxidante é qualquer substância que retarda, previne ou remove dano oxidativo de uma molécula alvo".

As defesas antioxidantes podem ser divididas em quatro grupos: (1) as primárias, de natureza enzimática ou não enzimática, que atuam diretamente sobre as espécies reativas; (2) as auxiliares, que atuam em conjunto com as primárias, recuperando ou sintetizando substratos das enzimas; (3) proteínas que complexam metais e compostos de baixo peso molecular que previnem a participação de metais na geração de espécies reativas; e (4) enzimas que reparam biomoléculas danificadas (LIMA, 2004).

Entre as defesas enzimáticas primárias encontram-se a catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e glutathione peroxidase (GPx). A catalase de mamíferos é um homotetrâmero, que contém um grupo heme e um NADPH por subunidade da proteína (LIMA, 2004), cuja função é catalisar a dismutação do peróxido de hidrogênio em oxigênio e água (BARREIROS; DAVID, J.M.; DAVID, J.P, 2006). A SOD é uma enzima que catalisa a dismutação do radical superóxido a oxigênio e peróxido de hidrogênio. Existem quatro tipos de superóxido dismutase (duas formas de Cu,Zn-SOD, a Mn-SOD e a Fe-SOD), que diferem em estrutura, distribuição e no metal ligado a elas (LIMA, 2004). A Cu, Zn-SOD ocorre no citosol e em outros compartimentos celulares e não tem sua atividade afetada pelo estresse oxidativo. Já a Mn-SOD ocorre exclusivamente na matriz mitocondrial e possui maior atividade em condições de estresse (BABIOR, 1997).

O sistema antioxidante da glutathione é composto pela GSH, GPx (glutathione peroxidase) e GR (glutathione redutase) (BARREIROS; DAVID, J.M.; DAVID, J.P,

2006). A glutathiona é o tiol não proteico mais abundante dos tecidos de mamíferos, formado por glutamato, cisteína e glicina. Esse tripeptídeo existe em duas formas, a reduzida (GSH) e a dissulfeto (GSSG) (KAPLOWITZ; AW; OOKHTENS, 1985), possui função antioxidante, participa da sinalização redox, destoxificação de xenobióticos e regulação da proliferação celular. A propriedade antioxidante da glutathiona está relacionada à atividade da glutathiona peroxidase, que utiliza GSH para catalisar a decomposição do peróxido de hidrogênio e outros hidroperóxidos, como alguns produtos da lipoperoxidação, e é capaz de decompor ONOO^- a NO_2 , diminuindo sua citotoxicidade. Uma vez oxidada a GSSG, a GSH pode ser regenerada pela glutathiona redutase. O balanço entre as formas reduzida e oxidada da GSH pode ser usado para determinar o estado redox da célula (HOLMGREN *et al.*, 2005). A GSSG produzida pela oxidação da GSH na reação da GPx, então é reduzida pela glutathiona redutase, com gasto de NADPH (LIMA, 2004; LU, 2013). Além disso, a GSH age como antioxidante ao reagir com radicais centrados no carbono, oxigênio singlete, radical hidroxila e espécies reativas de nitrogênio (LIMA, 2004).

As glutathiona S-transferases representam uma família de enzimas envolvidas na conjugação de xenobióticos eletrofílicos e produtos da peroxidação lipídica, com a GSH (LIMA, 2004; WU; DONG, 2012; BOARD; MENON, 2013).

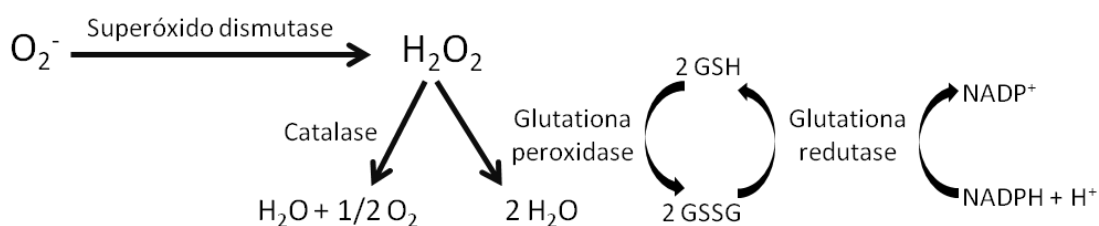


FIGURA 1 - Reações catalisadas pelas enzimas Superóxido dismutase, Catalase, Glutathiona Peroxidase e Glutathiona Redutase. Fonte: a autora.

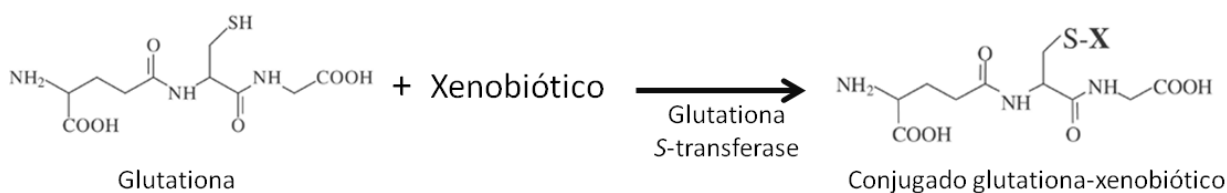


FIGURA 2 - Reação catalisada pela Glutathiona S-Transferase. Fonte: a autora.

Além das defesas antioxidantes enzimáticas, existem as não enzimáticas, representadas por moléculas produzidas pelo organismo e adquiridas da dieta. Entre elas, encontram-se a glutathione, melanina, melatonina, ácido úrico, ascorbato (vitamina C), carotenoides, tocoferóis (vitamina E) e polifenóis (LIMA, 2004; BARREIROS; DAVID, J.M.; DAVID, J.P, 2006).

2.5 ESPÉCIES REATIVAS E DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO

Sohal e Allen (1985), Sohal, Allen e Nations (1986) e mais tarde Allen e Ballin (1989), sugeriram que os radicais possuem um papel durante o desenvolvimento, alterando o estado redox das células e induzindo o desenvolvimento por alterar a expressão gênica. Segundo Allen e Ballin (1989), o que influencia o desenvolvimento dos tecidos é o "gradiente metabólico", sendo que tecidos mais próximos da fonte de oxigênio e nutrientes possuem uma maior taxa metabólica e induzem o desenvolvimento de regiões mais distantes.

Há evidências de que as espécies reativas participam de vias de sinalização de importantes processos durante o desenvolvimento, como proliferação, diferenciação, apoptose e migração. Muitas dessas vias, controladas por fatores de crescimento, regulam a produção de EROS, que são usadas como moléculas de transdução de sinal regulando a atividade de quinases e fosfatases (COVARRUBIAS *et al.*, 2008). Essas vias muitas vezes terminam com a ativação de fatores de transcrição (HERNÁNDEZ-GARCIA *et al.*, 2010). Diferentes tipos celulares apresentam respostas diferenciadas a variação na concentração de oxigênio e de EROS (ALLEN; BALIN, 1989).

Assim como há variação na concentração de oxigênio e na formação de espécies reativas, também são observadas variações nas defesas antioxidantes ao longo do desenvolvimento (TABELA 1).

TABELA 1 - Variação nas defesas antioxidantes de coelhos, ratos, camundongos e humanos ao longo do desenvolvimento fetal, neonatal e adulto

Defesa Antioxidante	Organismo	Variação	Órgão	Período de Vida	Referência
Atividade SOD	Rato	aumento	cérebro pulmão sangue	Primeiros 80 dias de vida	NAKAGAWARA; NATHAN; COHN, 1981; GERDIN; TYDE; ERIKSSON, 1985; UTSUMI <i>et al.</i> , 1977.
		aumento	fígado pulmão	feto→neonato neonato→adulto feto→neonato→adulto	YOSHIOKA; UTSUMI; SEKIBA, 1977; NOVAK <i>et al.</i> , 1978.
	Camundongo	aumento	pulmão	neonato→adulto	FRANK; BUCHER; ROBERTS, 1978.
		aumento	fígado	feto→adulto	NOVAK <i>et al.</i> , 1978.
	Humano	aumento	pulmão	feto→neonato→adulto	AUTOR; FRANK; ROBERTS, 1976.
		aumento	placenta	Desenvolvimento fetal	VAN HIEN; KOVACS; MATKOVICS, 1974.
Atividade CAT	Rato	aumento	pulmão	feto→neonato	FRANK; BUCHER; ROBERTS, 1978.
		aumento	cérebro	neonato→adulto	MAVELLI <i>et al.</i> , 1982.
		aumento	fígado	Desenvolvimento fetal	TSUKADA; MOCHIZUKI; KONISHI, 1968.
	Camundongo	aumento	pulmão	feto→neonato	FRANK; BUCHER; ROBERTS, 1978.
		aumento	intestino	Desenvolvimento fetal	CALVERT; MENARD, 1978.
Atividade GPx	Rato	aumento	pulmão	feto→adulto neonato→adulto	FRANK; BUCHER; ROBERTS, 1978; YOSHIOKA; SHIMADA; SEKIBA, 1980.
		aumento	cérebro fígado	neonato→adulto	PROHASKA, GANTHER, 1976; DEMUS-OOLE;

					SWIERCZEWSKI, 1969.
		aumento	fígado	Desenvolvimento fetal	DILLIO <i>et al.</i> , 1986.
		aumento	placenta	Desenvolvimento fetal	DILLIO <i>et al.</i> , 1986.
Atividade					
Glutathione	Rato	aumento	placenta fígado	Desenvolvimento fetal	DILLIO <i>et al.</i> , 1986
Redutase					
Atividade					
Glutathione	Camundongo	aumento	fígado	primeiros 60 dias de vida	GREGUS; VARGA; SCHMELAS, 1985.
S-transferase	Rato	aumento	fígado	primeiros 60 dias de vida	GREGUS; VARGA; SCHMELAS, 1985.

2.6 EMBRIÃO DE AVE COMO MODELO

As aves constituem um modelo altamente utilizado em laboratório para estudos de embriologia comparada e biologia do desenvolvimento, pois apresentam diversas vantagens em relação a outras espécies. São de fácil obtenção, manipulação, possuem desenvolvimento curto e semelhante ao de outros grupos animais, como os mamíferos, porém independente da mãe e de nutrientes externos.

A espécie de ave mais utilizada em laboratório é a *Gallus gallus* (galinha), cujo desenvolvimento inicial pode ser comparado ao dos humanos até o segundo mês de gestação. A clivagem nas aves tem início 3 horas após a fecundação, o que corresponderia a 24 horas após a fertilização em humanos. O terceiro dia, quando são formados os somitos, cérebro, olhos, ouvidos e componentes do sistema vascular equivale a terceira - quarta semana de gestação em humanos. Já o quarto dia de incubação, corresponderia ao segundo mês de desenvolvimento humano intrauterino (MOORE, PERSAUD, 2008).

O desenvolvimento embrionário da galinha é muito bem documentado (HAMBURGER; HAMILTON, 1951) e os embriões são classificados em estádios, que relacionam o surgimento de estruturas no embrião e o tempo de desenvolvimento. A divisão em estádios é importante, pois vários fatores - diferenças genéticas, sazonais, tamanho dos ovos, tempo entre a postura e a incubação dos ovos, temperatura dos ovos quando colocados na incubadora,

temperatura, tipo e tamanho da incubadora - podem causar variações nos embriões, o que torna ineficiente a classificação baseada somente na idade cronológica. Do estágio 7 ao 14 a classificação é baseada principalmente no número de pares de somitos, enquanto que do estágio 15 em diante, os critérios utilizados para identificação dos estádios embrionários são baseados em estruturas externas, como os brotos dos membros e arcos viscerais (HAMBURGER; HAMILTON, 1951).



FIGURA 3 - *Gallus gallus*, fêmea adulta e indivíduos jovens. Fonte: Embrapa.

O embrião de ave também tem sido utilizado como modelo para estudo dos efeitos de agentes tóxicos sobre o desenvolvimento embrionário. Através da análise de diferentes biomarcadores - morfológicos (VAN STEENIS; VAN LOGTEN, 1971; YAMAMOTO *et al.*, 2012), bioquímicos (HADANI; EGYED, 1967; BRUNSTRÖM, 1992; WANG, Y-M.; WANG, H-J.; PENG, 2008; YAMAMOTO *et al.*, 2012), genéticos, moleculares (THOMPSON *et al.*, 2010; DOI *et al.*, 2011) - é possível investigar a ação de xenobióticos nos embriões em desenvolvimento.

2.7 DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO DE *Gallus gallus*

As aves apresentam ovos do tipo telolécito, que possui grande quantidade de vitelo (GILBERT, 2003). No ovo estão presentes todos os componentes necessários ao desenvolvimento do embrião, exceto o oxigênio, que entra pelos poros presentes na casca (BELLAIRS, OSMOND, 2005).

O processo de clivagem é do tipo meroblástica discoidal e ocorre somente no citoplasma ativo no polo animal do ovo (GILBERT, 2003). A clivagem tem início aproximadamente 3 horas após a fecundação, logo que o ovo atinge o istmo, ainda no aparelho reprodutor da galinha. Após repetidas clivagens, no momento da postura, o embrião é composto por aproximadamente 32.000 - 60.000 células, formando o blastodisco (GILBERT, 2003; BELLAIRS, OSMOND, 2005).

Nas primeiras 24 horas de desenvolvimento, o blastodisco é dividido em área pelúcida e área opaca. A área pelúcida corresponde à região central, que está separada do vitelo pela cavidade subgerminativa, enquanto que a área opaca é formada por células da região marginal, que estão em contato com o vitelo. No momento da postura do ovo, o blastodisco é formado por duas camadas de células, o epiblasto, que dará origem ao embrião e alguns anexos embrionários (âmnio, córion, alantóide), e o hipoblasto, que formará apenas estruturas extraembrionárias (saco vitelino). Entre o epiblasto e o hipoblasto encontra-se uma cavidade, a blastocele (GILBERT, 2003; BELLAIRS, OSMOND, 2005).

Com aproximadamente 10 horas de incubação, tem início a gastrulação, um período de proliferação e migração celular (BELLAIRS, OSMOND, 2005), cujo marco inicial é o desenvolvimento da linha primitiva, formada inicialmente por um espessamento da camada de células na linha média do epiblasto. Essas células se estendem anteriormente, marcando o eixo ântero-posterior do embrião, e perdem a adesão, formando uma depressão na linha, o sulco primitivo, através da qual células do epiblasto irão migrar para a blastocele. Na extremidade anterior do sulco, há um espessamento de células, o nódulo primitivo (nódulo de Hensen). As células que ingressam na blastocele a partir do nódulo de Hensen, migram anteriormente e vão formar o intestino anterior, a mesoderme da cabeça e a notocorda, ao passo que as que ingressam pela fenda primitiva darão origem aos demais tecidos endodérmicos e mesodérmicos (GILBERT, 2003; BELLAIRS, OSMOND, 2005). Após 20 horas de incubação, a regressão da linha primitiva move o nódulo de Hensen para uma região mais posterior e há formação da notocorda da extremidade anterior para a posterior, à medida que a regressão ocorre (GILBERT, 2003). Ao final da gastrulação estão formados os folhetos germinativos: ectoderme, mesoderme e endoderme (BELLAIRS, OSMOND, 2005). A endoderme dará origem principalmente ao epitélio do trato respiratório, digestório, incluindo órgãos associados como pulmões e fígado. A mesoderme formará diversos tecidos, incluindo o sistema musculoesquelético,

tecido conjuntivo, sangue e órgãos internos como coração e rins. Já a ectoderme originará principalmente a epiderme e o sistema nervoso (WOLPERT *et al.*, 2008).

A neurulação é o processo pelo qual é formado o tubo neural, a partir da interação das células mesodérmicas da notocorda e da placa précardal com as células da ectoderme adjacente. Essa interação induz as células ectodérmicas a formarem a placa neural, a partir de 20 horas de incubação. A placa neural sofre uma invaginação na linha média, formando o sulco neural e as pregas neurais, as quais começam a se fundir com 26 horas de incubação. As células da porção mais dorsal do tubo neural se tornam as células da crista neural, que migram somente após o fechamento do tubo neural, separando-se do mesmo. As cristas neurais originarão diversas estruturas, incluindo aquelas do sistema nervoso periférico, enquanto que o tubo neural formará o encéfalo e a medula espinhal (GILBERT, 2003; BELLAIRS, OSMOND, 2005).

A somitogênese se inicia com aproximadamente 24 horas de incubação, formando progressivamente pares de somitos no sentido ântero-posterior. Cada par de somitos surge em intervalos de 90 minutos, na mesoderme paraxial de ambos os lados da notocorda. Essas estruturas darão origem aos moldes cartilagosos das vértebras, musculatura esquelética de praticamente todo o organismo e a derme da região dorsal do corpo (WOLPERT *et al.*, 2008). No terceiro dia de desenvolvimento o embrião de ave possui aproximadamente 40 pares de somitos, apresenta batimentos cardíacos e a circulação com as membranas extraembrionárias (saco vitelínico e alantóide) já está bem estabelecida (BELLAIRS, OSMOND, 2005).

Enquanto o embrião é formado, surgem também as membranas extraembrionárias, que fornecem proteção e nutrição ao embrião em desenvolvimento. O saco vitelínico e o alantoide são formados pela somatopleura (endoderme e mesoderme), enquanto que o âmnio e o córion pela esplancnopleura (ectoderme e mesoderme). O saco vitelínico provê nutrição ao embrião a partir do transporte de nutrientes do vitelo para o corpo do embrião através dos vasos que envolvem o saco. O alantoide armazena excretas em sua luz e ao se fundir com o córion para formar a membrana córioalantóica, realiza trocas gasosas e transporte do cálcio da casca para o embrião, através de seus vasos sanguíneos, o que torna a casca mais frágil e facilita a eclosão. O córion é a membrana extraembrionária mais externa, fica aderida a casca e permite as trocas gasosas com o ambiente. O âmnio

envolve o embrião, formando o saco amniótico, preenchido por um líquido que fornece proteção contra a desidratação e choques mecânicos. (GILBERT, 2003).

O desenvolvimento embrionário da galinha apresenta vários períodos críticos, em que o embrião está mais vulnerável a influências externas, como exposição a agentes tóxicos (SPREEN *et al.*, 1984 *apud* DEWITT; MEYER; HENSHEL, 2005). Segundo Christensen (2001), existem 5 períodos críticos: o primeiro corresponde ao período pré-oviposital, com duração de 18 a 20 horas, de intensa proliferação celular, em que diversas condições maternas como temperatura no oviduto e estado nutricional da mãe, influenciam na mortalidade dos embriões. O segundo compreende o tempo de pré-incubação, em que o desenvolvimento é estacionado e só é retomado quando o ovo é submetido às condições normais de incubação ($\pm 38^{\circ}\text{C}$). Nesse período, os parâmetros de umidade, ventilação e temperatura e o tempo entre a oviposição na viabilidade embrionária. O terceiro, quarto e quinto períodos críticos se passam durante o tempo de incubação. Do primeiro ao quarto dias (terceiro período) o embrião se adapta às condições de incubação e são retomadas a proliferação e diferenciação celulares. É nesse período que ocorre a organogênese, formação inicial dos órgãos (PATTEN, 1971), e a sensibilidade à temperatura e exposição a agentes tóxicos é alta. No quarto período, de 5 a 18 dias, o fator mais importante é a nutrição, devido ao intenso crescimento do embrião. O quinto período (19 a 21 dias) é considerado crítico, pois ocorrem eventos importantes que possibilitam a eclosão, como o correto posicionamento do bico e rompimento da membrana para que se inicie a respiração pulmonar.

2.8 O SISTEMA ANTIOXIDANTE DO EMBRIÃO DE GALINHA

Assim como há variação nos sistemas de defesa antioxidante dos mamíferos ao longo do desenvolvimento embrionário, fetal e pós-natal (FRANK; BUCHER; ROBERTS; 1978; AUTOR; FRANK; ROBERTS, 1976; TANSWELL; FREEMAN, 1984), nas aves essa mudança também acontece

Alguns estudos mais antigos analisaram a concentração de glutathione reduzida de embriões de galinha em diferentes períodos do desenvolvimento. Cazorla e Barron (1958) verificaram que o conteúdo de GSH dos embriões de

galinha aumenta exponencialmente de 68 a 279 h de incubação. Boldyrev *et al.* (1988) demonstraram que o conteúdo de glutatona, em músculo da perna e peito de embriões de galinha, aumenta do 9º ao 20º dia de incubação. Já nos períodos de pré-eclosão, eclosão e desenvolvimento pós-natal, o nível de glutatona decresce praticamente a zero. Surai (1999) demonstrou que a concentração de GSH em fígado e cérebro de embriões de galinha é maior no 10º dia de incubação e decresce após esse período permanecendo relativamente constante entre o 15º dia e a eclosão.

A atividade das enzimas antioxidantes SOD, GPx e catalase em alguns períodos do desenvolvimento do embrião de galinha também já foram estudadas. Wilson, Lui e Del Maestro (1992) compararam a atividade de enzimas antioxidantes em fígado e cérebro de embriões e verificaram que no cérebro, a atividade da GPx duplica nas duas últimas semanas do desenvolvimento, porém permanece menor que a hepática. De maneira diferente, a atividade da catalase cerebral é reduzida em quatro vezes no período do 8º ao 20º dia, enquanto que a hepática é aumentada.

Surai (1999) também obteve resultados interessantes sobre a atividade da GPx, catalase e SOD em fígado, cérebro, pulmão, músculo, rim e coração de embriões de galinha do 9º ao 23º dia de desenvolvimento. Nesse estudo, a atividade da GPx hepática se mostrou 30 vezes maior ao nascimento do que no 10º dia de desenvolvimento, enquanto que a cerebral se manteve baixa e constante. A atividade da SOD no fígado foi máxima no 11º de incubação, com uma queda brusca até o 15º dia, a partir do qual permaneceu constante e duas vezes menor que a cerebral. A catalase cerebral apresentou baixa atividade no período, enquanto que a hepática, que era alta no 10º dia foi reduzida à metade até o 19º dia.

Visto que na literatura a maioria dos trabalhos descrevem o desenvolvimento do sistema antioxidante de embriões de *Gallus gallus* em embriões em estádios do desenvolvimento mais tardios, o objetivo do nosso trabalho foi estudar as defesas antioxidantes do embrião de galinha em períodos mais precoces do desenvolvimento.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Verificar a modulação do sistema de defesa antioxidante do embrião de ave, nos estádios compreendidos entre o 3º e 10º dias de incubação.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a atividade das enzimas catalase, superóxido dismutase e glutathione S-transferase nos embriões de 3 a 10 dias de incubação.
- Avaliar a concentração tióis não proteicos, representados principalmente pela glutathione, nos embriões com tempo de desenvolvimento de 3 a 10 dias.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MODELO BIOLÓGICO

Neste trabalho foram utilizados 560 embriões de *Gallus gallus*. A quantidade de embriões presente em cada *pool* está relacionada na Tabela 2. Os embriões de cada grupo foram coletados em pelo menos três experimentos diferentes.

TABELA 2 - Quantidade de embriões utilizados em 1 *pool* de acordo com o tempo de incubação.

Período de incubação (dias)	3	4	5	6	7	8	9	10	
Quantidade de embriões	8	8	4	4	1	1	1	1	Total de embriões
Total de embriões por grupo	160	160	80	80	20	20	20	20	560

Os ovos de galinha fertilizados foram fornecidos por uma empresa local. Após a chegada ao laboratório, os ovos foram selecionados, os que apresentavam rachaduras foram descartados e os demais higienizados com papel toalha umedecido com etanol 70%. Após a higienização, os ovos foram pesados para que todos tivessem peso aproximado ($61,93 \text{ g} \pm 0,2119$) e incubados, com a câmara de ar voltada para cima em incubadora BOD, a 38°C , com umidade e ventilação controladas. A anotação do peso foi feita a lápis na própria casca. Os ovos foram virados duas vezes ao dia. A temperatura interna da incubadora foi registrada duas vezes ao dia.

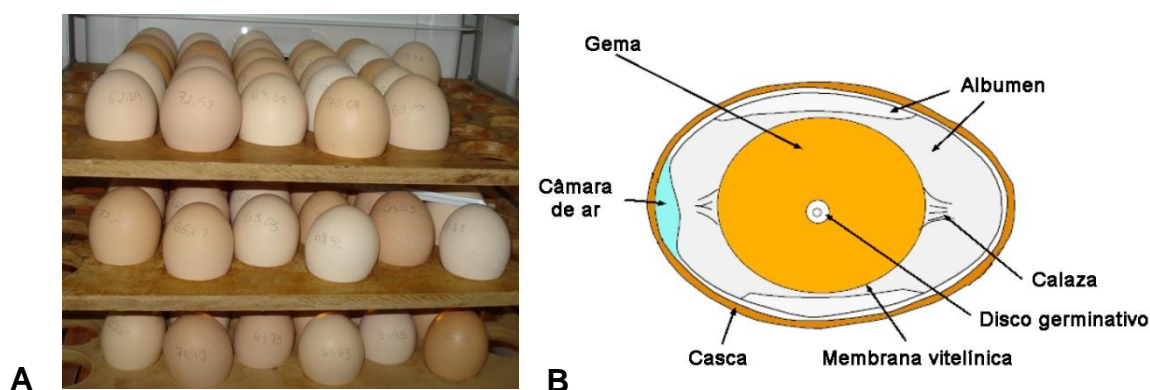


FIGURA 4 - A: Ovos incubados em incubadora do tipo BOD, com temperatura e umidade controladas. Fonte: a autora. B: Desenho esquemático do ovo. Fonte: Expedição Vida.

Os embriões de 3 a 10 dias de incubação (Figura 5) foram coletados (Figura 6), separados em pools, de acordo com a Tabela 2, armazenados em tubos do tipo eppendorf, congelados e mantidos a -76°C até o momento da análise. O material foi então descongelado e homogeneizado em PBS (NaCl a $136,5 \text{ mM}$, KCl a $2,68 \text{ mM}$, Na_2HPO_4 a $5,4 \text{ mM}$, KH_2PO_4 a $1,76 \text{ mM}$, pH 7,8) gelado, centrifugados a 12.000 g por 20 min a 4°C . A centrifugação foi repetida, sempre que necessário, até que o sobrenadante ficasse cristalino. O sobrenadante foi separado e $50 \mu\text{l}$ aliquoteado para a quantificação de proteínas totais. Os sobrenadantes e as alíquotas foram armazenados a -76°C até a realização das análises.

Somente embriões considerados vivos, que apresentavam batimentos cardíacos no momento da abertura do ovo, foram coletados, os demais foram descartados. Entre os indivíduos considerados vivos no momento da abertura do ovo, $2,28\%$ deles foram perdidos na coleta, sendo todos embriões de 3 dias de incubação. Não houve perda de indivíduos a partir do quarto dia.

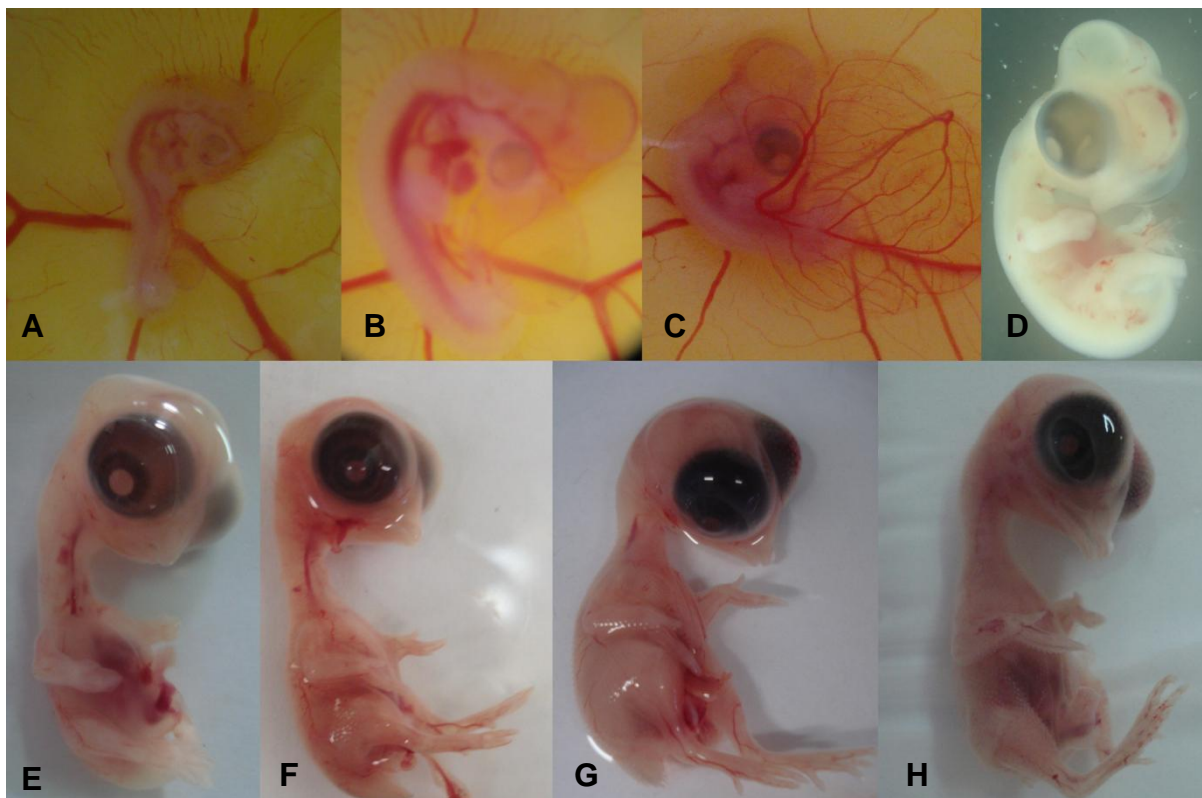


FIGURA 5 - Embriões de galinha de 3 a 10 dias de incubação. A: 3. B: 4. C: 5. D: 6. E: 7. F: 8. G: 9. H: 10 dias. Fonte: a autora.

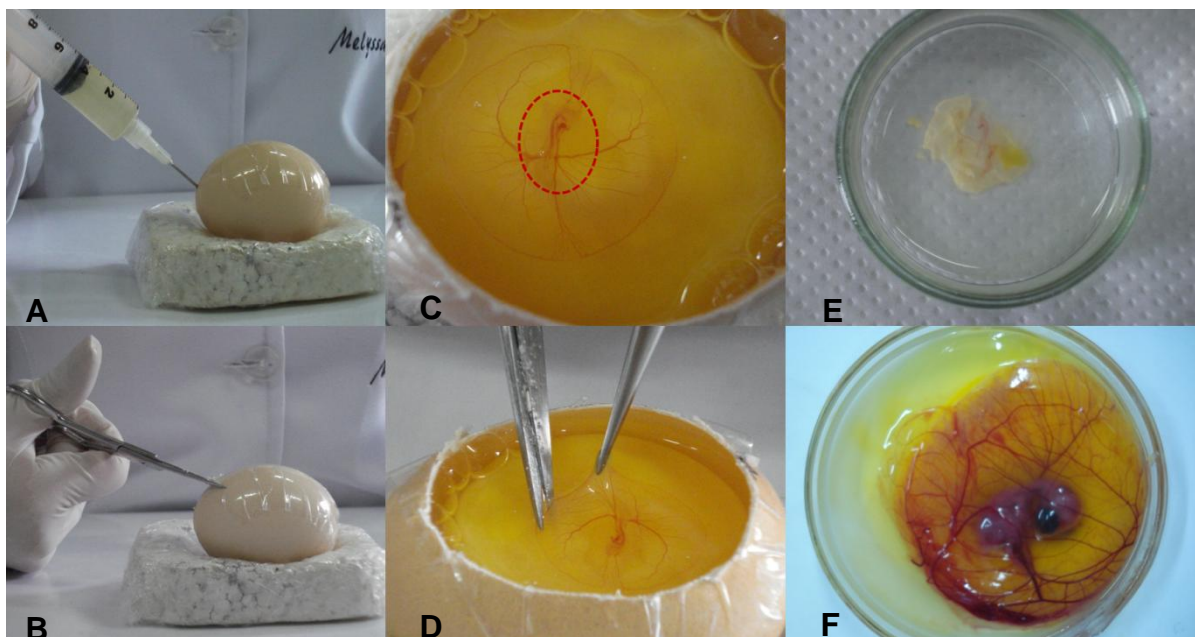


FIGURA 6 - Coleta dos embriões. A: Para a coleta de embriões de 3 dias, estádios 19 a 23 (HAMBURGER; HAMILTON, 1951), uma fita adesiva foi colada na casca, no local onde é feita a abertura para a visualização do embrião. Com o auxílio de uma seringa e uma agulha, um pouco do albúmen é retirado. B: Utilizando uma tesoura, é feita uma abertura na casca, a partir da qual é possível visualizar o disco embrionário. C: embrião (tracejado). D: O embrião e parte do saco vitelínico foram recortados, (E) lavados em PBS gelado, e o saco vitelínico retirado. F: Ovos com mais de 3 dias de incubação, são quebrados e o seu conteúdo despejado em uma placa de Petri, o embrião é retirado, lavado em PBS e separado das membranas extraembrionárias. Fonte: a autora.

A classificação dos embriões em estádios (estadiamento) foi feita de acordo com Hamburger e Hamilton (1951). Para cada tempo de incubação foram considerados os estádios de acordo com a Tabela 3. Os embriões que não apresentavam as características correspondentes ao tempo de incubação foram descartados.

TABELA 3 - Relação dos estádios de desenvolvimento e suas características, correspondentes ao tempo de incubação (HAMBURGER; HAMILTON, 1951, modificado)

Tempo de incubação	Estádios	Principais características
(dias)		
3	19	<ul style="list-style-type: none"> • Olhos despigmentados. • O contorno da parte posterior do tronco é contínuo com a base da cauda. • Broto da cauda é curvado, voltado para a região anterior.
3	20	<ul style="list-style-type: none"> • Broto das pernas claramente maiores do que o broto das asas. • Curva na região caudal começa a se estender para frente na região lombo-sacral. • Rotação do tronco completa. • Olhos com tonalidade acinzentada fraca.
3	21	<ul style="list-style-type: none"> • Brotos das pernas e asas ligeiramente assimétricos. • O contorno dorsal do tronco é reto ou ligeiramente dobrado. • Olhos com pigmentação fraca.
3	22	<ul style="list-style-type: none"> • Brotos dos membros alongados, voltados para a região caudal. • O contorno dorsal do tronco é reto ou curvado.
3-4	23	<ul style="list-style-type: none"> • Membros maiores que no estágio 22, possuem aproximadamente a mesma largura e comprimento. • O contorno dorsal da parte posterior do cérebro até cauda é uma linha curva.
4	24	<ul style="list-style-type: none"> • Brotos das asas e pernas mais longos do que largos. • Placa digital na asa ainda não está demarcada. • Dedos dos pés ainda não demarcados.
4	25	<ul style="list-style-type: none"> • Articulações distintas nas pernas e asas. • Placa digital distinta na asa, porém ainda sem demarcações dos dígitos. • Indicações de fracos sulcos na perna demarcando o terceiro dedo do pé.
4-5	26	<ul style="list-style-type: none"> • Contorno das placas digitais arredondadas indicando um leve sulco entre o segundo e terceiro dígitos. • Demarcação dos três primeiros dedos distintos.
5	27	<ul style="list-style-type: none"> • Sulcos entre o primeiro, segundo e terceiro dígitos indicados. • Sulcos entre os dedos dos pés são distintos. • Bico pouco reconhecível.
5	28	<ul style="list-style-type: none"> • Segundo dígito e terceiro dedo do pé maiores que os demais, dando um contorno pontudo aos membros. • Três dígitos e quatro dedos do pé distintos. • Bico se torna distinto na vista de perfil.

6	29	<ul style="list-style-type: none"> • Asa dobrada na articulação. • Segundo dígito nitidamente mais longo que os demais. • Sulcos rasos entre o primeiro, segundo e terceiro dígito. • Do segundo ao quarto dedos há cristas separadas por sulcos distintos com indicações de redes entre eles. • Bico mais proeminente que do estágio 28.
6	30	<ul style="list-style-type: none"> • Os três principais segmentos do braço e perna são claramente demarcados. • Sulcos entre primeiro e segundo dígito são distintos. • Asas e pernas encontram-se dobradas na articulação. • O processo mandibular se aproxima do bico, mas a diferença entre os dois é ainda visível.
7	31	<ul style="list-style-type: none"> • Indicação de uma rede entre o primeiro e o segundo dígitos. • Distância entre a mandíbula e o bico se estreitou e aparece como uma pequena fenda.
7	32	<ul style="list-style-type: none"> • Todos os dígitos e os 4 dedos do pé alongados. • Redes entre dígitos e dedos dos pés são finas e possuem contorno côncavo. • Diferenças de tamanho entre os dígitos e dedos dos pés se tornam evidentes. • Extremidade anterior da mandíbula alcançou o bico.
7-8	33	<ul style="list-style-type: none"> • Terceiro dígito se torna distinguível. • Todos os dígitos e dedos do pé se alongaram. • Mandíbula e pescoço se alongaram.
8	34	<ul style="list-style-type: none"> • Crescimento diferencial do segundo dígito e terceiro dedo do pé é evidente. • Alongamento da mandíbula e pescoço.
8-9	35	<ul style="list-style-type: none"> • Redes entre dígitos e dedos dos pés se tornam discretas. • Alongamento do bico. • Falanges nos dedos dos pés são distinguíveis.
10	36	<ul style="list-style-type: none"> • Primórdios das unhas são visíveis somente na extremidade dos dedos dos pés e no primeiro dígito da asa. • O primórdio da crista aparece como uma elevação com borda ligeiramente serrilhada ao longo da linha média dorsal do bico.

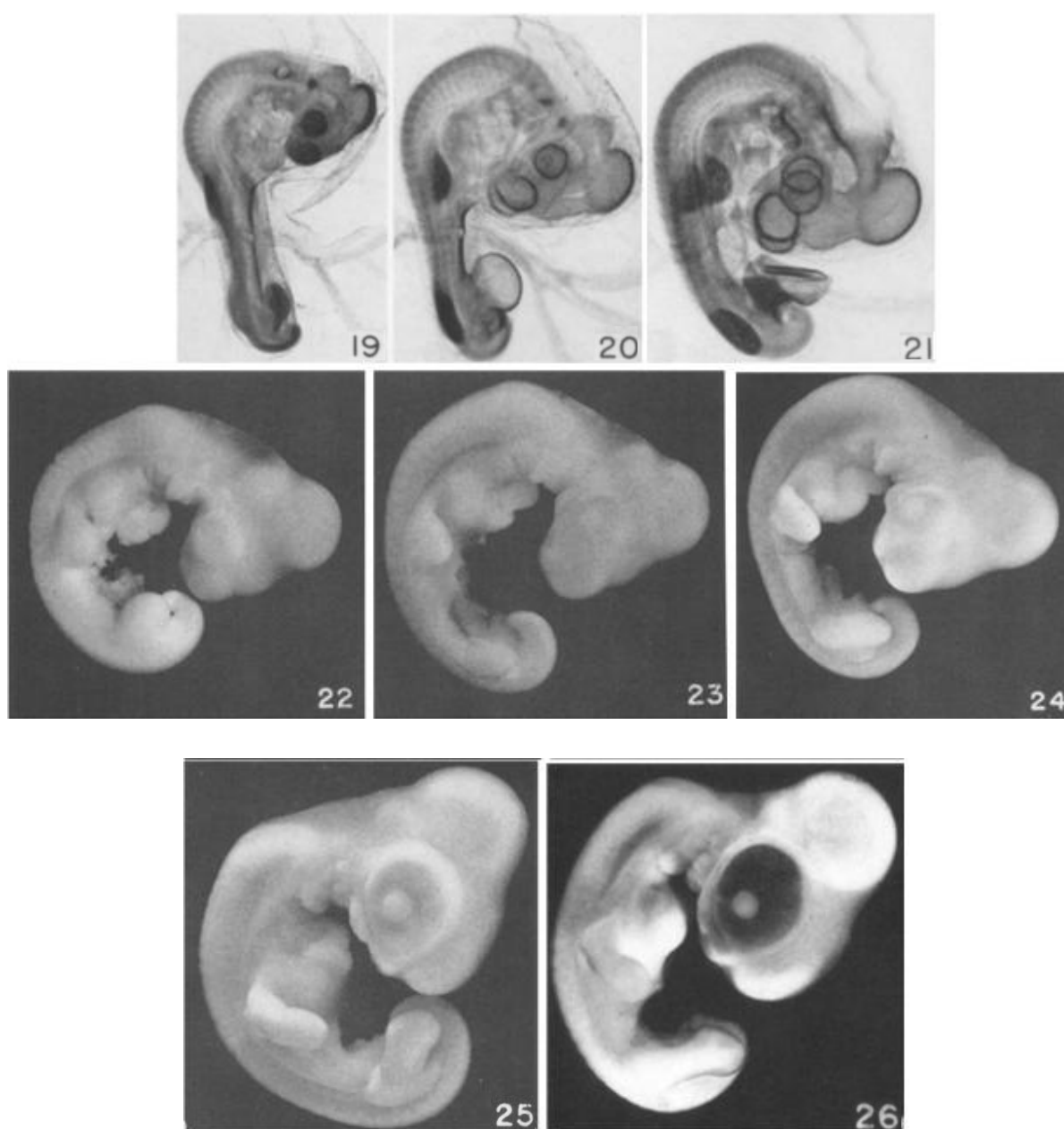


FIGURA 7 - Embriões nos estádios embrionários 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 e 26. Fonte: HAMBURGER; HAMILTON, 1951.



FIGURA 8 - Embriões nos estádios embrionários 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 e 36. Fonte: HAMBURGER; HAMILTON, 1951.

4.2 CONCENTRAÇÃO PROTEICA

Para determinar a quantidade de material utilizado para as análises bioquímicas foi realizada a quantificação de proteínas no sobrenadante das amostras. Para isso, foi utilizado o método de Bradford (1976), que se baseia na interação entre o corante Coomassie Brilliant Blue (BG-250) e proteínas. Essa interação provoca deslocamento no equilíbrio do corante para sua forma aniônica, que absorve luz no comprimento de onda de 595 nm.

Primeiramente os sobrenadantes das amostras foram testados para verificar se necessitavam ser diluídos ou não, ou seja, se estavam dentro da curva padrão de BSA (albumina de soro bovino). Para isso, foram pipetados em poços separados de uma microplaca, 10 µl de amostra de cada grupo experimental e 10 µl de cada concentração da curva-padrão de albumina de soro bovina (0; 0,125; 0,250; 0,500; 1,0 mg(BSA).ml⁻¹). Então, adicionou-se sobre os poços 250 µl do reativo de Bradford.

Após definidas e realizadas as diluições, foram pipetados 10 µl de cada amostra, descongelada em banho de gelo, e do branco (PBS), ambos em duplicata, e 10 µl de cada concentração da curva-padrão (0; 0,125; 0,250; 0,500; 1,0 mg(BSA).ml⁻¹), em quadruplicata, em microplaca de 96 poços. Em seguida, foram adicionados 250 µl de reativo de Bradford. Após 5 min, com a placa protegida da luz, a absorbância foi medida a 595 nm. A concentração de proteínas foi calculada através de comparação com a curva-padrão de albumina de soro bovina através da fórmula:

$$[proteínas] = \frac{[(Média\ ABS-branco) \times diluição]}{a}, \text{ onde: a concentração de proteínas é}$$

expressa em miligramas de proteína por mililitro; a diluição é a que foi utilizada para que as amostras ficassem com concentrações de proteína dentro da curva padrão; a = coeficiente angular da curva padrão.

Após o cálculo da concentração proteica, as amostras foram normalizadas (diluídas) para 3 mg.ml⁻¹ e alíquotas foram reservadas para as análises.

4.3 SISTEMA ANTIOXIDANTE

A fim de avaliar o sistema de defesa antioxidante do embrião de ave entre o 3º e 10º dias de incubação, foram medidas a concentração de tióis não protéicos e a atividade das enzimas glutathione S-transferase, catalase e superóxido dismutase.

4.3.1 Concentração de tióis não protéicos como a GSH

A avaliação da concentração de glutatona e outros tióis não protéicos foi realizada segundo Sedlak e Lindsay (1968). Esse método tem como princípio a precipitação de proteínas pelo ácido tricloroacético e a posterior separação dos tióis não protéicos, que reagem com o DTNB (ácido 5-5'-ditiobis-2-nitrobenzóico), gerando um produto que absorve luz a 415 nm.

Foram adicionados 50 µl de solução de ácido tricloroacético a 50%, em 200 µl de sobrenadante ainda congelado das amostras normalizadas para 3 mg.ml⁻¹ de proteína. As amostras foram misturadas e então centrifugadas a 5000 g por 10 min, a 4°C. Na placa de 96 poços foram pipetados 50 µl de cada concentração da curva padrão de GSH (160, 80, 40, 20, 10, 5 e 0 µM), 50 µl do branco (PBS + TCA) e 50 µl do sobrenadante das amostras, em poços separados, todos em triplicata. Em todos os poços foram pipetados 230 µl de tampão (Tris-base 0,4M, pH 8,9) e 20 µl de solução de DTNB ([DTNB] = 2,5 mM). Após 10 min a temperatura ambiente, foi medida a absorbância a 415 nm.

A concentração de tióis não protéicos foi calculada através da equação da reta dos valores de absorbância da curva-padrão de GSH, utilizando a seguinte fórmula:

$$[Tióis] = \frac{(Média\ ABS - branco) \times 1,25}{a \times [proteínas]}, \text{ onde: a concentração de tióis não protéicos é}$$

expressa em nmoles de tióis não protéicos por miligrama de proteína; diluição = 200 µl de amostra em 50 µl de TCA, ou seja 1,25 vezes; a = coeficiente angular da curva padrão; a concentração de proteínas totais é em miligramas de proteína por mililitro.

4.3.2 Atividade da Glutathione S-transferase

O método utilizado para avaliar a atividade da glutathione S-transferase foi o de Keen, Habig e Jakoby (1976), com adaptações. O princípio desta técnica está na reação do 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) com a glutathione (GSH), catalisada pela GST, levando a formação de um tioéter que pode ser monitorada pelo aumento da absorbância a 340 nm.

Foram utilizadas amostras normalizadas para 3mg.mL^{-1} de proteína em PBS. As amostras foram descongeladas no gelo, e em seguida, 20 μL de cada amostra e 20 μL de branco (PBS) foram adicionados em placa de 96 poços, ambos em triplicata. Em seguida foram pipetados 180 μL de meio de reação ([GSH] = 1,5 mM; [CDNB] = 2 mM; tampão fosfato de potássio, 0,1 M, pH 6,5). A absorbância foi medida imediatamente a 340 nm, por 250 s, em intervalos de 50 s.

A atividade da GST foi calculada por meio da fórmula:

$$\text{Atividade} = \frac{(\Delta\text{ABS.min}^{-1} \times 10)}{5,76 \times [\text{proteína}]}$$
, onde: a atividade da GST é expressa em μmoles de tioéter formado por minuto por miligrama de proteína; diluição = 20 μL de amostra em 180 μL de meio de reação, ou seja 10 vezes; caminho óptico x coeficiente de extinção molar = $9,6 \times 0,6 = 5,76$; a concentração de proteínas totais é em miligramas de proteína por mililitro.

4.3.3 Atividade da Superóxido dismutase

A atividade da superóxido dismutase foi analisada segundo Kono (1978) e Crouch *et al.* (1981). Esse método baseia-se na capacidade da enzima SOD em inibir a redução do azul de nitrotetrazólio (NBT) a formazan pelo radical superóxido gerado pela hidroxilamina. A redução do NBT foi medida por espectrofotômetro a 560 nm.

Foram utilizados 200 μL de cada amostra, normalizadas para 3mg.mL^{-1} de proteína. Adicionou-se 66,6 μL de etanol, misturou-se e centrifugou-se a 12000 g, 0-4°C, por 20 min. Então, 10 μL do sobrenadante da amostra e 10 μL de etanol 25% em tampão (branco) foram pipetados, em duplicata, em microplaca de 96 poços. Em todos os poços foram adicionados, 70 μL de solução de NBT ([NBT] final na microplaca = 100 μM) e 120 μL de solução de hidroxilamina ([hidroxilamina] final na microplaca = 36,85 mM) para iniciar a reação. A absorbância foi medida a 560 nm a cada intervalo de 1 min por 30 min e após 1 h, 1,5 h e 2 h de incubação, a temperatura ambiente, protegida da luz.

A atividade da superóxido dismutase foi calculada por meio da fórmula:

$$\text{Atividade} = \left[\left(\frac{\Delta\text{Abs}}{h} \text{ do branco} \right) - \left(\frac{\Delta\text{Abs}}{h} \text{ da amostra} \right) - 1 \right] \times 20$$
, onde: a redução do NBT a formazan na ausência de amostra (branco) foi utilizada como

curva de referência; a atividade da SOD é expressa em unidades de atividade por miligrama de proteínas, sendo que cada unidade equivale a atividade capaz de inibir a redução do NBT em 50%; diluição da amostra = 10 µl em 200 µl, ou seja 20 vezes; a concentração de proteínas é em miligramas por mililitro.

4.3.4 Atividade da Catalase

A atividade da catalase foi avaliada pelo método baseado em Aebi (1984), a partir do qual é medido o decréscimo da absorbância a 240 nm, devido à degradação do peróxido de hidrogênio em oxigênio e água.

Em uma cubeta de quartzo foram adicionados 990 µl de meio de reação (Tampão Tris-HCl 50 mM, EDTA 0,25 mM, pH 8,0; [H₂O₂] = 30 mM), seguida de 10 µl de amostra ou branco. O material foi misturado por inversão e a absorbância foi medida, em espectrofotômetro, imediatamente a 240 nm durante 1 a 5 min, com intervalos de leitura de 1 s.

4.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados obtidos foram analisados no software GraphPad Prism 5.0, utilizando-se Análise de Variância de uma Via (*one way ANOVA*) seguido do pós-teste de *Tukey*, quando aplicável.

5 RESULTADOS

5.1 CONCENTRAÇÃO DE TIÓIS NÃO PROTEICOS COMO A GSH

Não houve diferença estatística entre os grupos 3, 4 e 5 dias (são iguais) e 3, 4 e 6 dias. Do quinto ao sexto dia houve redução da concentração de tióis não proteicos de 13,49 para 9,68 nmol.mg prot⁻¹. Os valores encontrados para a concentração de tióis não proteicos não foram estatisticamente distintos entre os grupos 6 e 7 dias, da mesma maneira que entre os 7, 8, 9 e 10 dias. Do sexto ao oitavo dia, a concentração de tióis não proteicos foi reduzida em 48%, de 9,68 para 5,06 nmol.mg prot⁻¹.

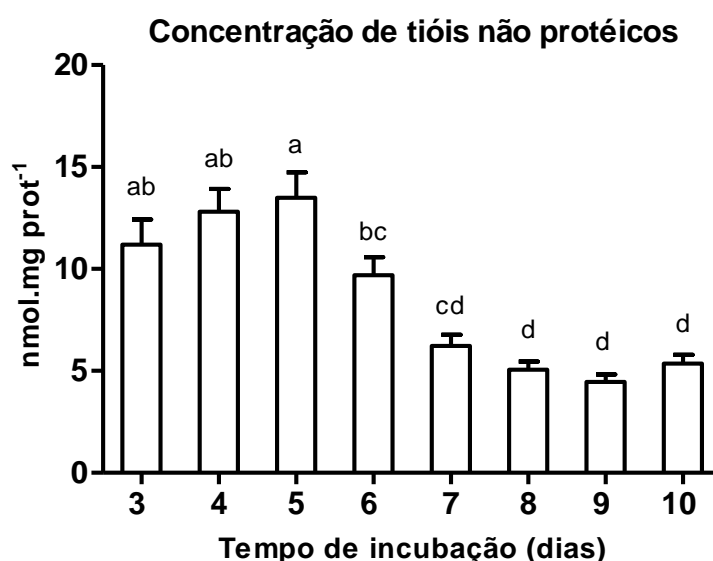


FIGURA 9 - Concentração de glutathiona e outros tióis não protéicos em embriões de galinha (*Gallus gallus*). Média e erro padrão da média. As letras diferentes indicam grupos estatisticamente distintos ($p < 0.05$).

5.2 ATIVIDADE DA GLUTATIONA S-TRANSFERASE

A atividade da glutathiona S-transferase aumentou gradualmente do terceiro ao nono dia de desenvolvimento, sendo que no nono dia é aproximadamente duas

vezes maior do que no oitavo e cinco vezes maior que no terceiro dia ($9^{\circ} = 0,045 \mu\text{moles CDNB-GSH.min}^{-1}.\text{mg de prot}^{-1}$, $8^{\circ} = 0,023 \mu\text{moles CDNB-GSH.min}^{-1}.\text{mg de prot}^{-1}$, $3^{\circ} = 0,009 \mu\text{moles CDNB-GSH.min}^{-1}.\text{mg de prot}^{-1}$). Após esse período, no décimo dia, a atividade da enzima foi reduzida novamente quase à metade, retornando a valores semelhantes ao 8º dia.

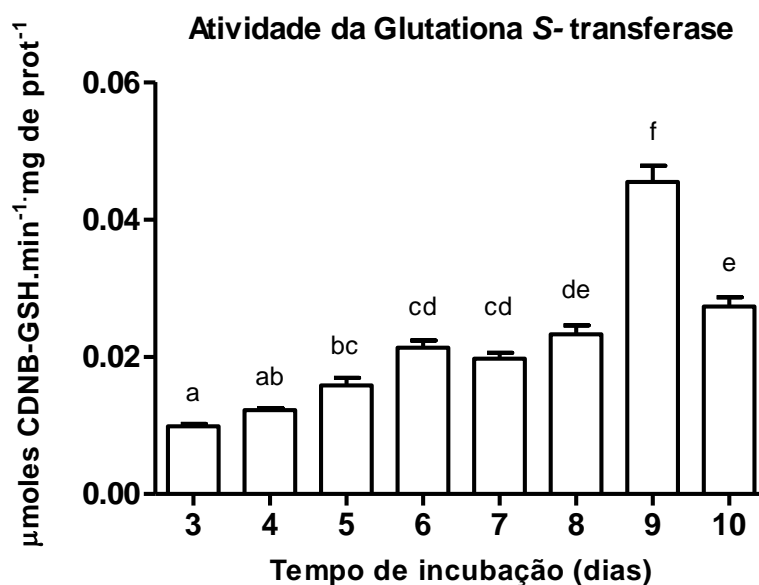


FIGURA 10 - Atividade da Glutathiona S-transferase, em embriões de galinha (*Gallus gallus*). Média e erro padrão da média. As letras diferentes indicam grupos estatisticamente distintos ($p < 0.05$).

5.3 ATIVIDADE DA SUPERÓXIDO DISMUTASE

O ensaio foi realizado, porém ocorreu falha na geração de radical superóxido, pois a fonte geradora não foi eficiente. A quantidade reduzida de material disponível de cada amostra impossibilitou a repetição da análise. Dessa forma não foi possível mensurar a atividade da enzima superóxido dismutase neste momento.

5.4 ATIVIDADE DA CATALASE

Foi realizado um teste com um pequeno número de amostras, de 3 e 4 dias, a fim de avaliar a sensibilidade do método. Constatou-se que a atividade é muito baixa para ser detectada eficientemente pelo método. Devido a isso, foi decidido não realizar o ensaio com todas as amostras, sob o risco de perdê-las. Futuramente, a avaliação da atividade da catalase será realizada com adaptações para microplacas de 96 poços UV-Star®, que permitirá uma maior relação amostra/meio de reação do que as cubetas de quartzo de 1ml.

TABELA 4 - Resultados para a concentração de tióis não proteicos e atividade das enzimas: glutathione S-transferase, superóxido dismutase e catalase. Média \pm erro padrão da média. As letras diferentes indicam grupos estatisticamente distintos ($p < 0.05$). (**) Indica o maior valor encontrado entre os grupos, (*) indica o menor valor.

	Defesa antioxidante	Concentração de tióis não proteicos (nmol.mg prot ⁻¹)		Atividade da GST (μ moles CDNB-GSH.min ⁻¹ .mg de prot ⁻¹)		Atividade da Superóxido dismutase	Atividade da Catalase
Dias de Incubação	3	11,2 \pm 1,232	ab	0,009868 \pm 0,0003635	a *	Não foi possível mensurar	Não foi possível mensurar
	4	12,82 \pm 1,109	ab	0,01224 \pm 0,0002876	ab		
	5	13,49 \pm 1,247	a **	0,01581 \pm 0,001098	bc		
	6	9,683 \pm 0,8841	bc	0,02132 \pm 0,001070	cd		
	7	6,229 \pm 0,5527	cd	0,01970 \pm 0,0008600	cd		
	8	5,063 \pm 0,3893	d	0,02325 \pm 0,001312	de		
	9	4,464 \pm 0,3648	d *	0,04548 \pm 0,002322	f **		
	10	5,35 \pm 0,4462	d	0,02733 \pm 0,001348	e		

6 DISCUSSÃO

As vantagens da utilização do embrião de ave como modelo incluem a facilidade de obtenção e manipulação, tempo de desenvolvimento curto e com estádios iniciais comparáveis ao desenvolvimento humano. Essa semelhança permite que estudos que avaliam a embriotoxicidade de contaminantes, extrapolem seus resultados à toxicidade humana. Porém, apesar das facilidades na utilização desse modelo, foram encontradas dificuldades com os embriões de 3 dias, já relatadas por Yamamoto (2009), com embriões de 2 dias. Os embriões nos primeiros

estádios são frágeis e possuem tamanho reduzido. Isso dificulta a coleta e algumas vezes leva a perda do embrião em meio ao conteúdo do saco vitelínico, rompido durante a abertura do ovo. Além disso, o tamanho também torna mais difícil a obtenção de quantidade suficiente de amostra, o que eleva o número de ovos utilizados, e requer abordagens metodológicas mais sensíveis para a detecção de atividades enzimáticas, como a da catalase.

Na literatura a grande parte dos trabalhos que descrevem o desenvolvimento do sistema antioxidante em embriões de *Gallus gallus* são antigos e estudam o comportamento dos componentes da defesa antioxidante em embriões em estádios de desenvolvimento mais tardios. Além disso, os estudos foram feitos na maioria das vezes em órgãos específicos, não considerando o embrião como um todo. De maneira diferente, o nosso trabalho teve como objetivo estudar as defesas antioxidantes dos embriões em estádios mais precoces do desenvolvimento.

Houve redução da concentração de glutathione do 5º ao 6º e do 6º ao 8º dias de incubação, comportamento diferente do observado por Cazorla e Barron (1958), que quantificaram a GSH em ovos (albúmen, gema, albúmen e gema) e embriões e constataram que o conteúdo de GSH aumenta exponencialmente do 2º ao 11º dias de incubação. Até 140 horas o aumento se dá pelo transporte da GSH da gema para o embrião e a partir desse período inicia-se a síntese de GSH pelo corpo do embrião, quando o fígado torna-se funcionalmente ativo (CAZORLA; BARRON, 1958). Essa diferença pode estar associada às condições de nutrição e saúde das progenitoras, que influenciam na qualidade dos ovos e na viabilidade dos embriões (GONZALES, 2005), visto que, como sugerido por Cazorla e Barron (1958), nos primeiros 6 dias a glutathione disponível ao embrião é a presente no vitelo, produzido pelo organismo da mãe.

Wilson, Lui e Del Maestro (1992), avaliaram os níveis de glutathione dissulfeto e reduzida em cérebro e fígado de embriões de 6 a 20 dias de incubação e verificaram que a concentração de glutathione hepática varia, sendo máxima no 12º dia, ao contrário da cerebral, que permanece praticamente constante. Essa variação temporal nas defesas antioxidantes entre os tecidos reflete períodos particulares de diferenciação celular (WILSON, LUI, DEL MAESTRO, 1992), que não pode ser percebida quando se utiliza o embrião inteiro (como no presente estudo), já que as defesas antioxidantes são avaliadas no embrião como um todo.

A partir dos resultados encontrados nesse trabalho verificou-se que no período de desenvolvimento estudado, 3 a 10 dias de incubação, houve redução das defesas não enzimáticas (GSH) e aumento das enzimáticas (GST). Assim, por um possível mecanismo de compensação, o equilíbrio entre os estados oxidante e redutor pode ser estabelecido, de forma a permitir um ambiente favorável, necessário para que os eventos de proliferação, diferenciação e crescimento do embrião ocorram normalmente (DENNERY, 2004). O balanço redox, promovido pelas defesas antioxidantes, é particularmente importante durante os períodos críticos do desenvolvimento, em que vários fatores podem interferir na viabilidade embrionária e levar a morte do embrião.

A atividade metabólica das células pode ser modulada pela disponibilidade de oxigênio, que em vertebrados é determinada pela vascularização diferencial (HERNÁNDEZ-GARCIA *et al.*, 2010). Dessa forma, pode-se sugerir que à medida que o desenvolvimento do embrião de galinha avança e a ampla vascularização das membranas extraembrionárias se estabelece, proporcionando maior superfície para a realização das trocas gasosa com o ambiente, o suprimento de oxigênio ao embrião aumenta, elevando as taxas metabólicas e as forças oxidantes.

A enzima glutathione S-transferase participa das reações de fase II (conjugação) do metabolismo, em que produtos das reações de fase I (funcionalização) são conjugados com a glutathione, gerando na maioria dos casos produtos menos tóxicos ou inócuos (RANG, DALE, RITTER, 2004). Assim, pode-se sugerir que o aumento da atividade da glutathione S-transferase observado do terceiro ao décimo dia de incubação, protege o embrião contra condições oxidantes e consome a glutathione disponível, que tem sua concentração reduzida. Da mesma maneira, em humanos, um menor fornecimento de oxigênio no início da gestação permite que o embrião, mais sensível ao estresse oxidativo, se implante e passe pelo processo de organogênese, de forma que quando a circulação utero-placentária se estabelece, e o suprimento de oxigênio aumenta, o embrião já teve suas defesas antioxidantes aprimoradas e é capaz de suportar condições pró-oxidantes (BURTON, 2009).

As atividades da SOD e catalase não puderam ser avaliadas nesse trabalho, porém outros estudos já demonstraram o comportamento dessas enzimas em períodos mais tardios do desenvolvimento do embrião de ave. Surai *et al.* (1999) constataram diferentes níveis de atividade de duas isoformas de SOD, utilizando

outra metodologia, em vários órgãos de pintos recém eclodidos, sendo que a maior atividade dessa enzima foi encontrada no fígado. A metodologia empregada nesse estudo utilizou xantina e xantina oxidase para gerar o radical superóxido.

Surai (1999) avaliou a atividade da catalase pelo mesmo método utilizado nesse trabalho, o de Aebi (1984), porém em diferentes períodos de desenvolvimento - do 10º ao 22º dia (1 dia após a eclosão) - e verificou que a catalase hepática tem sua atividade reduzida a metade do décimo ao décimo nono dia, enquanto que a cerebral permaneceu constante. No trabalho de Steil (2013), foi avaliada a atividade da catalase em embriões com 3 dias de desenvolvimento expostos ao cádmio, porém também não foi possível mensurar a atividade da enzima.

Em mamíferos a variação na atividade de enzimas antioxidantes durante o desenvolvimento já foi melhor estudada, porém grande parte dos trabalhos avaliam as diferenças nas defesas antioxidantes, em órgãos, entre neonatos e adultos. No presente trabalho, não foi possível avaliar a atividade da catalase em embriões de ave de 3 e 4 dias, porém já foi demonstrado que em ratos e camundongos essa enzima é mais ativa em tecido pulmonar de neonatos do que em indivíduos adultos (FRANK, BUCHER, ROBERTS, 1978). Já durante o desenvolvimento fetal, a atividade da catalase pulmonar é muito baixa, não podendo ser mensurada (YOSHIOKA, SHIMADA, SEKIBA, 1980). A atividade da SOD se eleva de maneira expressiva após o nascimento, devido a maior exposição ao oxigênio (HITCHLER, DOMANN, 2007). Pelo método utilizado esse trabalho não foi possível mensurar a atividade da SOD nos embriões de ave. Em pulmão de coelhos adultos, a atividade da SOD é 390 % maior do que a de fetos, enquanto que em ratos, essa diferença é de 103 % (FRANK, BUCHER, ROBERTS, 1978).

As metodologias para avaliar a atividade das GSTs são na maioria das vezes inespecíficas para as diferentes izoenzimas (ALLEN, BALIN, 1989). A partir dos dados obtidos nesse trabalho, observou-se um aumento gradual da atividade da GST nos embriões de 3º a 9º dias de incubação. Gregus, Varga e Schmela (1985) demonstraram que a atividade das glutathione S-transferases em fígado de ratos e camundongos, aumenta nos primeiros 60 dias do desenvolvimento pós-natal, enquanto que em coelhos essa variação ocorre nos 120 primeiros dias. Já as glutathione S-transferases presentes em pulmão, rins e intestino de coelhos, tem sua atividade reduzida no período pré-natal e aumentada após o nascimento (JAMES et al., 1977).

7 CONCLUSÕES

A defesa antioxidante dos embriões tende a se tornar mais robusta à medida que o desenvolvimento avança, em resposta ao maior suprimento de oxigênio ao embrião em formação. A partir dos dados obtidos nesse trabalho, pode-se sugerir que há um aumento das defesas enzimáticas (GST) e redução das não enzimáticas (GSH) ao longo do desenvolvimento nos períodos estudados. Isso deverá ser confirmado com análises de outros sistemas como SOD, CAT e glutathione peroxidase em trabalhos futuros.

8 PERSPECTIVAS FUTURAS

Pretende-se dar continuidade a esse trabalho, avaliando o desenvolvimento do sistema antioxidante no embrião de galinha até o nascimento, porém a partir de amostras de órgãos como fígado, cérebro, músculo estriado esquelético e cardíaco. Além disso, é necessário padronizar a avaliação da atividade da catalase utilizando outra metodologia, a fim de melhorar a sensibilidade do método.

9 REFERÊNCIAS

AEBI, H. Catalase *in vitro*. **Methods in Enzymology**, v. 105, n. 1947, p. 121–126, 1984.

ALLEN, R.; BALIN, A. Oxidative influence on development and differentiation: an overview of a free radical theory of development. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 6, p. 631–661, 1989.

AUTOR, A. P.; FRANK, L.; ROBERTS, R. J. Developmental characteristics of pulmonary superoxide dismutase: relationship to idiopathic respiratory distress syndrome. **Pediatric Research**, v. 10, p. 154–158, 1976.

BABIOR, B. M. Superoxide: a two-edged sword. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 30, p. 141–155, 1997.

BARREIROS, A.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química nova**, v. 29, n. 1, p. 113–123, 2006.

BAYNE, B. L., BROWN, D. A., BURNS, K., DIXON, D. R., IVANOVICI, A., LIVINGSTONE, D. A., LOWE, D. M., MOORE, M. N., STEBBING, A. R. D., WIDDINGS, J. **The Effects of Stress and Pollution on Marine Animals**. New York: Praeger, 1985.

BELLAIRS, R.; OSMOND, M. **The Atlas of Chick Development**. 2. ed. San Diego: Elsevier, 2005.

BOARD, P. G.; MENON, D. Glutathione transferases, regulators of cellular metabolism and physiology. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1830, n. 5, p. 3267–88, 2013.

BOLDYREV, A.; DUPIN, A.; SIAMBELA, M.; STVOLINSKY, S. L. The level of natural antioxidant glutathione and histidine-containing dipeptides in skeletal muscles of developing chick embryos. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 89, n. 1, p. 197–200, 1988.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, p. 248–54, 1976.

BRUNSTRÖM, B. induction of 7-ethoxyresorufin O-deethylase in chick embryos by polychlorinated biphenyls and polycyclic aromatic hydrocarbons having Ah receptor affinity. **Chemico-biological interactions**, v. 81, p. 69–77, 1992.

BURTON, G. J. Oxygen, the Janus gas: its effects on human placental development and function. **Journal of anatomy**, v. 215, p. 27–35, 2009.

CALVERT, R. ; MENARD, D. Cytochemical and biochemical studies on the differentiation of microperoxisomes in the small intestine of the fetal mouse. **Developmental Biology**, v. 65, p. 342-252, 1978.

CAZORLA, A.; BARRON, E. The formation of glutathione and the development of some enzymes for carbohydrate metabolism during the development of chicken embryo. **Experimental cell research**, v. 79, p. 68–79, 1958.

CROUCH, R. K.; GANDY, S. E.; KIMSEY, G.; GALBRAITH, R. A.; GALBRAITH, G. M. P.; BUSE, M. G. The inhibition of islet superoxide dismutase by diabetogenic drugs. **Diabetes**, v. 30, n. 3, p. 235–41, 1981.

CHRISTENSEN, V.L. Factors associated with early embryonic mortality. **World's Poultry Science Journal**, v. 57, p.359-372, 2001.

COVARRUBIAS, L.; HERNÁNDEZ-GARCIA, D.; SCHNABEL, D.; SALAS-VIDAL, E.; CASTRO-OBREGÓN, S. Function of reactive oxygen species during animal development: Passive or active? **Developmental biology**, v 320, p. 1-11, 2008.

CULLINANE, J.; BANNIGAN, J.; THOMPSON, J. Cadmium teratogenesis in the chick: period of vulnerability using the early chick culture method, and prevention by divalent cations. **Reproductive toxicology**, v. 28, n. 3, p. 335–41, 2009.

DALLE-DONNE, I.; ROSSI, R.; COLOMBO, R.; GIUSTARINI, D.; MILZANI, A. Biomarkers of oxidative damage in human disease. **Clinical chemistry**, v. 52, n. 4, p. 601–23, 2006.

DEMUS-OOLE, A.; SWIERCZEWSKI, E. Glutathione peroxidase in rat liver during development. **Biology of the Neonate**, v. 14, p. 211-218, 1969.

DENNERY, P. A. Role of redox in fetal development and neonatal diseases. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 6, n. 1, p. 147–153, 2004.

DEWITT, J. C.; MEYER, E. B.; HENSHEL, D. S. Environmental toxicity studies using chickens as surrogates for wildlife: effects of injection day. **Archives of environmental contamination and toxicology**, v. 48, n. 2, p. 270–7, 2005.

DHALLA, N. S.; TEMSAH, R. M.; NETTICADAN, T. Role of oxidative stress in cardiovascular diseases. **Journal of hypertension**, v. 18, n. 6, p. 655–73, 2000.

DILLIO, C.; BOCCIO, G. D.; CASALONE, E.; ACETO, A.; SACCHETTA, P. Activities of enzymes associated with metabolism of glutathione in fetal rat liver and placenta. **Biology of the Neonate**, v. 49, p. 96-101, 1986.

DOI, T.; PURI, P.; MCCANN, A.; BANNIGAN, J.; THOMPSON, J. Epigenetic effect of cadmium on global de novo DNA hypomethylation in the cadmium-induced ventral body wall defect (VBWD) in the chick model. **Toxicological Sciences**, v. 120, n. 2, p. 475–480, 2011.

EXPEDIÇÃO VIDA. **Expedição vida**. Como acontece a formação dos pintinhos nos ovos? 28 de janeiro de 2014. Disponível em: <<http://expedicaovida.com.br/como-acontece-a-formacao-dos-pintinhos-nos-ovos-fotos-chocantes/>>. Acesso em 16/12/2014.

FANGUY, R. C. Embriologia - o início da vida. In: CAMPOS, E. J.; SILVA, J. M. L.; SILVA, E. N. **Produção e qualidade de pintos de um dia**. Belo Horizonte: Embrapa - DTC, 1981. p 113-119.

FRANK, L.; BUCHER, J. R.; ROBERTS, R. J. Oxygen toxicity in neonatal and adult animals of various species. **Journal of Applied Physiology**. v. 45, p 699-704, 1978.

GARGIONI, R.; NETO, F. F.; BUCHI, D. F.; RANDI, M. A. F.; FRANCO, C. R. C.; PALUDO, K. S.; PELLETIER, E.; FERRARO, M. V. M.; CESTARI, M. M.; BUSSOLARO, D.; RIBEIRO, C. A. O. Cell death and DNA damage in peritoneal macrophages of mice (*Mus musculus*) exposed to inorganic lead. **Cell Biology International**, v. 30, p. 615-623, 2006.

GERDIN, E.; TYDEN, O.; ERIKSSON, U. J. The development of antioxidant enzymatic defense in the perinatal rat lung: activities of superoxide dismutase, glutathione peroxidase, and catalase. **Pediatric Research**, v. 19, p. 687-691, 1985.

GILBERT, S. F. **Biologia do Desenvolvimento**. 5. ed. Ribeirão Preto: FUNPEC, 2003.

GONZALES, E. Análise de problemas de eclodibilidade e fertilidade de plantéis avícolas por métodos de embriodiagnóstico. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ZOOTECNIA, 2005, Campo Grande . **Anais do ZOOTEC'2005**.

GONZALES, E.; CAFÉ, M.B. Produção de pintinhos com qualidade total. In: MACARI, M.; GONZALES, E. **Manejo da incubação**. 2. ed. Campinas: FACTA; 2003. p. 515-526.

GREGUS, Z.; VARGA, F.; SCHMELAS, A. Age-development and inducibility of hepatic glutathione S-transferase activities in mice, rats, rabbits and guinea-pigs. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 80, p. 85-90, 1985.

HADANI, A.; EGYED, M. N. Use of the chick embryo for testing the toxicity of cholinesterase-inhibiting compounds. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 10, p. 313-321, 1967.

HALLIWELL, B. Biochemistry of oxidative stress. **Biochemical Society transactions**, v. 35, pt. 5, p. 1147-50, 2007.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. **Free Radicals in Biology and Medicine**. New York: Oxford University Press, 2007.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M.; CROSS, C.E. Free radicals, antioxidants, and human disease: where are we now? **The Journal of laboratory and clinical medicine**, v. 119, n. 6, p. 598-620, 1992.

HALLIWELL, B.; WHITEMAN, M. Measuring reactive species and oxidative damage *in vivo* and in cell culture : how should you do it and what do the results mean ? **British Journal of Pharmacology**, v. 142, p. 231–255, 2004.

HAMBURGER, V.; HAMILTON, H. L. A series of normal stages in the development of the chick embryo. **Journal of morphology**, v. 88, n. 1, 1951.

HERNÁNDEZ-GARCIA, D.; WOOD, C. D.; CASTRO-OBREGÓN, S.; COVARRUBIAS, L. Reactive oxygen species: A radical role in development? **Free radical biology & medicine**, v. 49, p. 130-143, 2010.

HITCHLER, M. J.; DOMANN, F. E. An epigenetic perspective on the free radical theory of development. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 43, p. 1023–1036, 2007.

HOLMGREN, A.; JOHANSSON, C. B; BERNDT, C; LONN, M. E.; HUDEMANN, C.; LILLIG, C. H. Thiol redox control via thioredoxin and glutaredoxin systems. **Biochemical Society Transactions**, v. 33, p. 1375–1377, 2005.

HUSAIN, S. R.; CILURD, J.; CILLARD, P. Hydroxyl Radical Scavenging Activity of Flavonoids. **Phytochemistry**, v. 26, n. 9, p. 2489–2491, 1987.

JAMES, M. O.; FOUREMAN, G. L.; LAW, F. C.; BEND, J. R. The perinatal development of epoxide-metabolising enzyme activities in liver and extra hepatic organs of guinea pig and rabbit. **Drug Metabolism & Disposition**, v. 5, p. 19-28; 1977.

JENNER, P. Oxidative Stress in Parkinson ' s Disease. **Annals of Neurology**, v. 53, p. 26–38, 2003.

KAPLOWITZ, N.; AW, T. Y.; OOKHTENS, M. The regulation of hepatic glutathione. **Annual review of pharmacology and toxicology**, v. 25, p. 715–744, 1985.

KEEN, J. H.; HABIG, W. H.; JAKOBY, W. B. Mechanism for the Several Activities of the Glutathione. **The journal of biological chemistry**, v. 251, p. 6183–6188, 1976.

KONO, Y. Generation of superoxide radical during autoxidation of hydroxylamine and an assay for superoxide dismutase. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 186, n. 1, p. 189–95, 1978.

LIMA, M. H. Oxygen in biology and biochemistry: role of free radicals. In: STOREY, K. B.; **Functional Metabolism: Regulation and Adaptation**. John Wiley & Sons Inc, 2004. p.319–368.

LU, S. C. Glutathione synthesis. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1830, n. 5, p. 3143–53, 2013.

MAVELLI, I.; RIGO, A.; FEDERICO, R.; CIRIOLO, M. R.; ROTILIO, R.G. Superoxide dismutase, glutathione peroxidase and catalase in developing rat brain. **Biochemical Journal**, v. 204, p. 535-540, 1982.

MILLER, D. M.; BUETTNER, G. R.; AUST, S. D. Transition metals as catalysts of autoxidation reactions. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 8, n. 4, p. 95–108, 1990.

MIRANDA, A. L.; ROCHE, H.; RANDI, M. A. F.; MENEZES, M. L.; OLIVEIRA RIBEIRO, C. A. Bioaccumulation of chlorinated pesticides and PCBs in the tropical freshwater fish *Hoplias malabaricus*: Histopathological, physiological, and immunological findings. **Environment International**, v. 34, p. 939-949, 2008.

MOLENAAR, J. C.; MEIJERS, J. H. C; TIBBOEL, D. The chick embryo model of fetal malformation. In: HARRISON, M. R.; GOLBUS, M. S; FILLY, R. A. **The unborn patient - Prenatal diagnosis and treatment**. 2. ed. Philadelphia: Saunders co, 1991, p. 537-547.

MOORE, K. L.; PERSAUD, T. V. N. **Embriologia Clínica**. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.

NAKAGAWARA, A.; NATHAN, C. F.; COHN, Z. A. Hydrogen peroxide metabolism in human monocytes during differentiation *in vitro*. **Journal of Clinic Investigation**, v. 68, p. 1243-1252, 1981.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. Biological Markers in Environmental Health Research. **Environmental Health Perspectives**, v. 74, n. 1, p. 3, 1987.

PATTEN, B. M. **Early embryology of the chick**. 5. ed. New York: McGraw-Hill Book Company, 1971.

NOVAK, R.; MATKOVICS, M.; MARIK, M.; FACHET, J. Changes in mouse liver superoxide dismutase activity and lipid peroxidation during embryonic and postpartum development. **Experientia**, v. 34, p. 1134-1135, 1978.

PEAKALL, D. B. The role of biomarkers in environmental assessment (1). Introduction. *Ecotoxicology*, v. 3, n. 3, p. 157–60, 1994.

PROHASKA, J. R.; GANTHER, H. E. Selenium and glutathione peroxidase in developing rat brain. **Journal of Neurochemistry**, v. 27, p. 1379-1387, 1976.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M. **Farmacologia**. Elsevier, 5. ed, p. 434-449, 2004.

RIBEIRO, F.; GALLEGU-URREA, J. A.; JURKSHAT, K.; CROSSLEY, A.; HASSELLOY, M.; TAYLOR, C.; SOARES, A. M. V. M.; LOUREIRO, S. Silver nanoparticles and silver nitrate induce high toxicity to *Pseudokirchneriella subcapitata*, *Daphnia magna* and *Danio rerio*. **Science of the Total Environment**, p. 232-241, 2014.

RONSEIN, G. E.; MIYAMOTO, S.; BECHARA, E.; DI MASCIO, P.; MARTINEZ, G. R. Oxidação de proteínas por oxigênio singlete: mecanismos de dano, estratégias para detecção e implicações biológicas. **Química nova**, v. 29, n. 3., 2006.

ROSA, P. S; ZANELLA, V. Como nascem os pintinhos? **Embrapa**, 04 de julho 2011. Disponível em: <http://ccw.sct.embrapa.br/?pg=bloguinho_default&codigo=100>. Acesso em 05/11/2014.

SAILAJA, P. R.; KALVA, S.; YERRAMILI, A.; MAMIDI, S. Free Radicals and Tissue Damage: Role of Antioxidants. **Free Radicals and Antioxidants**, v. 1, n. 4, p. 2–7, 2011.

SAYRE, L. M.; SMITH, M. A; PERRY, G. Chemistry and biochemistry of oxidative stress in neurodegenerative disease. **Current medicinal chemistry**, v. 8, n. 7, p. 721–38, 2001.

SEDLAK, J.; LINDSAY, R. H. Estimation of total protein bound and nonprotein sulphhydryl groups in tissues with Ellman's reagent. **Analytical Biochemistry**, v. 25, p. 192-205, 1968.

SEN, S.; CHAKRABORTY, R. Free radicals, antioxidants, diseases and phytomedicines: current status and future prospect. **International jornal of Pharmaceutical Sciences Review and Research**, v. 3, n. 1, p. 91–100, 2010.

SIES, H. Oxidative Stress : Oxidants And Antioxidants. **Experimental Physiology**, v. 82, p. 291–295, 1997.

SIJM, D. T. H. M.; OPPERHUIZEN, A. Biotransformation, bioaccumulation and lethality of 2,8-dichlorodibenzo-pdioxin: a proposal to explain the biotic fate and toxicity of pcdd's and pcdf's. **Chemosphere**, v. 17, n. 1, p. 83-99, 1988.

SISMAN, T.; GEYIKOGLU, F. The teratogenic effects of polychlorinated naphthalenes (PCNs) on early development of the zebrafish (*Danio rerio*). **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 25, p. 83-88, 2008.

SOHAL, R. S.; ALLEN, R. G. Relationship between metabolic rate, free radicals, differentiation and aging: a unified theory. In: WOODHEAD, A. BLACKETT, A. D.; HOLLAENDER, A. **Molecular biology of aging**. New York: Plenum Press, 75-104, 1985.

SOHAL, R. S.; ALLEN, R. G.; NATIONS, C. Oxygen free radicals play a role in cellular differentiation: an hypothesis. **Free radical biology and medicine**, v. 2, p. 175-181, 1986.

SPREEN, O.; TUPPER, D.; RISSER, A.; TUOKKO, H.; EDGELL, D. **Human developmental neuropsychology**. New York: Oxford University Press, 1984.

STEIL, G. J. **Teratogênese e estresse oxidativo em embriões de *Gallus gallus* expostos ao cádmio**. 56 f. Monografia (Bacharelado em Ciências Biológicas) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2013.

SURAI, P. Tissue-specific changes in the activities of antioxidant enzymes during the development of the chicken embryo. **British poultry science**, v. 8, p. 397–405, 1999.

SURAI, P. F.; SPEAKE, B. K.; NOBLE, R. C.; SPARKS, N. H. C. Tissue-Specific Antioxidant Profiles and Susceptibility to Lipid Peroxidation of the Newly Hatched Chick. **Biological Trace Element Research**, v. 68, 1999.

TANSWELL, A. K.; FREEMAN, B. A. Pulmonary antioxidant enzyme maturation in the fetal and neonatal rat. **Pediatric Research**, v. 18, p. 584-587, 1984.

THOMPSON, J. M.; BANNIGAN, J. G. Omphalocele induction in the chick embryo by administration of cadmium. **Journal of pediatric surgery**, v. 42, n. 10, p. 1703–9, 2007.

THOMPSON, J.; DOI, T.; POWER, E.; BALASUBRAMAN, I.; PURI, P.; BANNIGAN, J. Evidence against a direct role for oxidative stress in cadmium-induced axial malformation in the chick embryo. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 243, n. 3, p. 390–8, 2010.

THOMPSON, J.; HIPWELL, E.; LOO, H. V.; BANNIGAN, J. Effects of cadmium on cell death and cell proliferation in chick embryos. **Reproductive toxicology**, v. 20, n. 4, p. 539–48, 2005.

TSUKADA, H.; MOCHIZUKI, Y.; KONISHI, T. Morphogenesis and development of microbodies of hepatocytes of rats during pre and postnatal growth. **Journal of Cell Biology**, v. 37, p. 231-243, 1968.

UTSUMI, K.; YOSHIOKA, T.; YAMANAKA, N.; NAKAZAWA, T. Increase in superoxide dismutase activity concomitant with a decrease in lipid peroxidation during post partum development. **FEBS Letters**, v. 79, p. 1-3, 1977.

VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; CRONIN, M. T. D.; MAZUR, M.; TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 39, n. 1, p. 44–84, 2007.

VAN DER OOST, R.; BEYER, J.; VERMEULEN, N. P. E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environmental toxicology and pharmacology**, v. 13, n. 2, p. 57–149, 2003.

VAN HIEN, P.; KOVACS, K.; MATKOVICS, B. Properties of enzymes I. Study of superoxide dismutase activity changes in human placenta of different ages. **Enzyme**, v. 18, p. 341-347, 1974.

VAN STEENIS, G.; VAN LOGTEN, M. Neurotoxic effect of the dithiocarbamate tecoram on the chick embryo. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 686, p. 675–686, 1971.

WANG, L.; ZHENG, B.; MENG, W. Photo-induced toxicity of four polycyclic aromatic hydrocarbons, singly and in combination, to the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 71, p. 465–472, 2008.

WANG, Y-M.; WANG, H-J.; PENG, S-Q. Lipid peroxidation and antioxidant defense impairment in the hearts of chick embryos induced by *in ovo* exposure to Fusarium mycotoxin butenolide. **Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology**, v. 52, n. 7, p. 781–6, 2008.

WILSON, J.; LUI, E.; DEL MAESTRO, R. Developmental profiles of antioxidant enzymes and trace metals in chick embryo. **Mechanisms of ageing development**, v. 65, p. 51–64, 1992.

WOLPERT, L.; JESSELL, T.; LAWRENCE, P.; MEYEROWITZ, E.; ROBERTSON, E.; SMITH, KIM. **Princípios de biologia do desenvolvimento**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2008.

WU, B.; DONG, D. Human cytosolic glutathione transferases: structure, function, and drug discovery. **Trends in pharmacological sciences**, v. 33, n. 12, p. 656–68, 2012.

YAMAMOTO, F. O. **Padronização de metodologias aplicadas ao estudo da exposição de embriões de aves a contaminantes ambientais**. 52 f. Monografia (Bacharelado em Ciências Biológicas) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

YAMAMOTO, F. O.; NETO, F. F.; FREITAS, P. F.; OLIVEIRA RIBEIRO, C. A.; ORTOLANI-MACHADO, C. F. Cadmium effects on early development of chick embryos. **Environmental toxicology and pharmacology**, v. 34, n. 2, p. 548–555, 2012.

YOSHIOKA, T.; SHIMADA, T.; SEKIBA, K. Lipid peroxidation and antioxidants in the rat lung during development. **Biology of the Neonate**, v. 38, p. 161-168, 1980.

YOSHIOKA, T.; UTSUMI, K.; SEKIBA, K. Superoxide dismutase activity and lipid peroxidation of the rat liver during development. **Biology of the Neonate**, v 32, p. 147 153, 1977.